

MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação Biologia Celular e Molecular

PAPEL DOS PRODUTOS FINAIS DA GLICAÇÃO AVANÇADA NA
REDUÇÃO DE NÚMERO E REATIVIDADE DE MASTÓCITOS
INDUZIDO PELO TRATAMENTO PROLONGADO COM
GLICOCORTICOIDE

TÁSSIA SANTORO TELLES

Rio de Janeiro
Abril de 2016

Ficha catalográfica elaborada pela

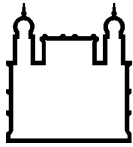
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ -
RJ

T274 Telles, Tássia Santoro

Papel dos produtos finais da glicação avançada na redução de número e reatividade de mastócitos induzido pelo tratamento prolongado com glicocorticoide / Tássia Santoro Telles. – Rio de Janeiro, 2016.

xiv, 68 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2016.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Tássia Santoro Telles

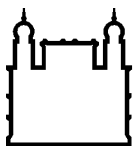
Papel dos Produtos Finais da Glicação Avançada na Redução do Número e Reatividade de Mastócitos Induzidos pelo Tratamento Prolongado com Glicocorticoide

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em 2016

Orientador: Prof. Dr. Vinicius de Frias Carvalho

RIO DE JANEIRO

Abril de 2016



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: TÁSSIA SANTORO TELLES

PAPEL DOS PRODUTOS FINAIS DA GLICAÇÃO AVANÇADA NA REDUÇÃO DO NÚMERO E REATIVIDADE DE MASTÓCITOS INDUZIDOS PELO TRATAMENTO PROLONGADO COM GLICOCORTICOIDE

ORIENTADOR: Prof. Dr. Vinicius de Frias Carvalho

Apresentado em: 20 / 04 / 2016

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Hugo Caire de Castro Faria Neto (Vice-Diretor de Pesquisa Desenvolvimento Tecnológico e Inovação do Instituto Oswaldo Cruz)

Prof. Dr. Emiliano de Oliveira Barreto (Professor Associado da Universidade Federal de Alagoas)

Profa. Dra. Maria das Graças Muller de Oliveira Henriques (Pesquisadora da Fundação Oswaldo Cruz)

SUPLENTE

Dra. Anissa Daliry (Pesquisadora Assistente no Laboratório de Investigação Cardiovascular)

Profa. Dra. Joseane Sabbadini Neves (Professora Adjunta III do Instituto de Ciências Biomédicas - ICB - Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ)

Rio de Janeiro, 20 de abril de 2016

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo apoio e carinho em todos os momentos, em especial à minha mãe Márcia Maria Santoro, ao meu pai Carlos Guimarães Telles Júnior e à minha irmã Sabrina Santoro Telles;

Ao amado Marcel Silva de Azevedo, pelo amor, dedicação, presença e afeto;

Aos meus sogros Élio de Azevedo Filho e Carmen Lúcia da Silva, pelo acolhimento e carinho;

Aos meus amigos do Laboratório de Inflamação, em especial ao Dr. Rafael Torres, à mestra Daniela Insuela, à mestranda Jéssika do Prado e à Nathalia Magalhães;

Aos meus amigos que direta ou indiretamente participaram da minha formação acadêmica, em especial à Maria Eduarda Oliveira;

Ao meu Orientador Dr. Vinicius de Frias Carvalho, pela paciência, competência e amizade;

Aos pesquisadores, tecnóloga e técnicos do Laboratório de Inflamação, pelos conselhos e ajuda;

Aos técnicos e veterinários do Biotério do Pavilhão Ozório de Almeida, pela ajuda com o cuidado com os animais;

À Dra Anissa pela revisão detalhada;

Aos membros titulares e suplentes da banca por aceitarem participar dessa defesa;

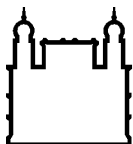
Ao órgão de fomento CAPES;

Aos queridos Tico e Pinhão, pelo carinho e aquecimento nos dias frios;

À minha amada avó, Maria Rosária Mannarino Santoro (*in memoriam*) pelo apoio, amizade e sabedoria.

“Do or do not. There is no try”

Mestre Yoda – Guerra nas Estrelas - O Império contra-ataca (1980)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

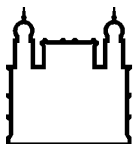
PAPEL DOS PRODUTOS FINAIS DA GLICAÇÃO AVANÇADA NA REDUÇÃO DE NÚMERO E REATIVIDADE DE MASTÓCITOS INDUZIDOS PELO TRATAMENTO PROLONGADO COM GLICOCORTICÓIDE

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO em BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Tássia Santoro Telles

Os glucocorticóides (GC) são importantes medicamentos anti-inflamatórios para o tratamento de doenças inflamatórias crônicas. Alguns dos efeitos da terapia com GC são: a inibição da geração de mediadores pró-inflamatórios e redução do número de células inflamatórias, incluindo mastócitos (MC). Além disso, os GC apresentam vários efeitos metabólicos, incluindo hiperglicemia com geração concomitante de produtos finais de glicação avançada (AGEs). AGEs induzem apoptose de mastócitos através da ativação dos seus receptores. Neste trabalho, foi avaliado o papel dos AGEs em reduzir o número e reatividade de MC induzida por GCs. Ratos Wistar machos foram tratados com dexametasona (Dexa) (0,1 mg / kg; s.c.), uma vez ao dia, durante 21 dias. Alguns dos ratos foram tratados com aminoguanidina (AG) (50 ou 250 mg/kg; v.o.), GSC-100 (1 mg/kg, v.o.) ou de FPS-ZM1 (1 mg/kg, i.p.) diariamente, a partir do 4º dia de administração de Dexa. Após 24 horas da última administração das drogas, analisamos número de MC por meio de coloração com azul de toluidina; reatividade MC por meio de quantificação da histamina após estímulo imunológica (reação passiva) ou estímulo não imunológico (composto 48/80); apoptose de MC por TUNEL e expressão de receptores dos AGEs, RAGE e galectina (GAL-3), por western blot. O tratamento com Dexa diminuiu o número e reatividade de MC e em paralelo aumentou a taxa de apoptose em comparação com ratos não tratados. O tratamento concomitante com AG foi capaz de restaurar o número, a reatividade e apoptose dos MC. Ao analisar o sangue, observamos que Dexa não foi capaz de alterar os níveis de frutossamina (albumina glicada). O tratamento com GCs não interferiu com a formação de AGEs, por outro lado, observou-se que o tratamento com Dexa aumenta a expressão de RAGE e Gal-3, e o tratamento com AG restaura a expressão destes receptores para níveis basais. Além disso, o tratamento com GCs levou a atrofia muscular e uma redução no peso corporal e no número de linfócitos, parâmetros estes que não foram alterados pelo tratamento com AG. Finalmente, foi mostrado que quando se administrou inibidores seletivos de RAGE (FPS-ZM1) ou Gal-3 (GSC-100) em animais tratados com Dexa, o número de MC na cavidade peritoneal e o tecido mesentérico foi restaurado. Assim, podemos concluir que o mecanismo pelo qual GC reduz o número e reatividade de MC está associada com o aumento da expressão de receptores dos AGEs, sugerindo que o mecanismo pelo qual os glicocorticoides exercem seu efeito anti-inflamatório é diferente do mecanismo de geração de efeitos sistêmicos e metabólicos, uma vez que estes últimos não envolvem a participação de receptores dos AGEs.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ROLE OF ADVANCED GLICATION END-PRODUCTS IN REDUCTION OF THE NUMBER AND REACTIVITY OF MAST CELLS INDUCED BY PROLONGED TREATMENT WITH GLUCOCORTICOID

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN CELLULAR AND MOLECULAR BIOLOGY

TÁSSIA SANTORO TELLES

Glucocorticoids (GC) are important anti-inflammatory drugs for the treatment of chronic inflammatory diseases. Some of the effects of GC treatment are the inhibition of the generation of pro-inflammatory mediators and the reduction of the number of inflammatory cells including mast cells (MC). Furthermore, GC has multiple metabolic effects, including hyperglycemia with concomitant generation of advanced glycation end-products (AGEs). AGEs induce mast cell apoptosis through activation of its receptors. In this work, was evaluated the role of AGEs in reducing the number and reactivity of MC induced by GC. Male Wistar rats were treated with dexamethasone (Dexa) (0.1 mg / kg;. s.c.), once a day for 21 days. Some of the mice were treated with aminoguanidine (AG) (50 or 250 mg/ kg, v.o.), GSC-100 (1 mg/kg, p.o.) or FPS-ZM1 (1 mg/kg, i.p.) daily from day 4 of the Dexa administration. After 24 hours of the last administration of drug, number of MC was analyzed by staining with toluidine blue; MC reactivity through quantification of histamine after immune stimulation (passive reaction) or non-immunological stimulation (compound 48/80); MC apoptosis by TUNEL and expression of receptors of AGE, RAGE and galectin (Gal-3) by Western blot. Treatment with Dexa decreased the number and reactivity of MC and in parallel increased apoptosis rate compared with untreated rat. Concomitant treatment with AG was able to restore the number, the reactivity and apoptosis of MC. Additionally, we observed that Dexa was not able to change fructosamine serum levels levels. The treatment with GCs did not interfere with the formation of AGEs. In addition, it was observed that treatment with Dexa increases the expression of RAGE and Gal-3, and treatment with AG restores the expression of these receptors to basal levels. The treatment with GCs also lead to muscle atrophy and a decrease in body weight and in the number of lymphocytes, however those parameters were not affected by AG treatment. Finally, it was shown that when administered selective inhibitors of RAGE (FPS-ZM1) and Gal-3 (GSC-100) in animals treated with Dexa, the number of MC in the peritoneal cavity and mesenteric tissue was restored. Thus, we conclude that the mechanism by which GC reduces the number and MC reactivity is associated with the increase of AGEs receptor expression, suggesting that the mechanism by which glucocorticoids exert their anti-inflammatory effect is different from the mechanism of generation of systemic and metabolic effects, which do not involve the participation of receptors of AGEs.

Índice

Resumo	vii
Abstract	viii
1. Introdução	17
1.1. Glicocorticoides	17
1.1.1. Histórico	17
1.1.2. Mecanismo de ação	19
1.1.3. Uso de glicocorticoides em clínica	20
1.2. Mastócitos	22
1.2.1. Histórico	22
1.2.2. Maturação e características morfológicas	23
1.2.3. Mecanismos de desgranulação	24
1.2.4. Participação dos mastócitos em doenças	27
1.3. Produtos finais da glicação avançada	28
1.3.1. Definição e mecanismos de formação	28
1.3.2. Moléculas reguladoras e fármacos	29
2. Objetivo	31
2.1. Objetivo geral	31
2.2. Objetivos específicos	31
3. Material e métodos	32
3.1. Animais	32
3.2. Esquema de tratamento	32
3.3. Contagem de mastócitos	33
3.3.1. Na cavidade pleural	33
3.3.2. No mesentério	33
3.4. Isolamento de mastócitos	33
3.5. Ativação de mastócitos <i>in vitro</i>	34
3.6. Quantificação de histamina	34
3.7. Análise macro e microscópica da atrofia muscular	34
3.8. Western blot	34
3.8.1. Géis	35
3.8.2. Quantificação de proteína e preparo de amostras	35
3.8.3. Corrida de eletroforese	35
3.8.4. Transferência	36
3.8.5. Bloqueio e imunomarcção	36
3.9. Quantificação de frutossamina	36
3.10. Medição de glicemia	37
3.11. TUNEL	37
3.12. Silanização de lâminas	37
3.13. Análise de linfócitos circulantes	37
3.14. Soluções e drogas	38
3.14.1. Soluções	38
3.14.2. Drogas e reagentes	41
3.15. Análises estatísticas	41
4. Resultados	42

4.1. Avaliação do efeito do tratamento com AG sobre a redução do número e reatividade de mastócitos induzido por GC	42
4.2. Avaliação do efeito do tratamento com AG sobre os efeitos metabólicos e anti-inflamatórios induzidos por GC	46
4.3. Avaliação do efeito do tratamento com GC sobre os níveis de frutossamina e glicose	48
4.4. Avaliação do efeito do tratamento com GC sobre a expressão dos receptores dos AGEs nos mastócitos e na musculatura esquelética	49
4.5. Avaliação do efeito do tratamento com inibidores de receptores dos AGEs sobre a redução do número de mastócitos da cavidade peritoneal e mesentérico	51
5. Discussão	55
6. Conclusão	60
7. Referências	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	22
Figura 2	25
Figura 3	26
Figura 4	32
Figura 5	42
Figura 6	43
Figura 7	44
Figura 8	45
Figura 9	46
Figura 10	47
Figura 11	48
Figura 12	49
Figura 13	50
Figura 14	51
Figura 15	52
Figura 16	53
Figura 17	54

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

% - por cento

µm - micrômetro

µMol - micro mol

Â - área

ACTH - hormônio adrenocorticotrófico

AGE - produtos finais da glicação avançada

CRF - hormônio liberador de corticotrofina

Dexa - dexametasona

dl - decilitro

DMSO - dimetil sulfeto

g - grama

Gal-3 - galectina-3

GC - glicocorticóide

GH - hormônio de crescimento

GR - receptor de glicocorticóide

GRE - elemento de resposta a glicocorticóide

HPA - hipotálamo- hipófise- adrenal

i.p. - intra peritoneal

ICAM - molécula de adesão intracelular

Il-10 - interleucina 10

ikB - inibidor de NFκB

kg - quilo

l - litro

L-NAME - hidrocloreto de Nω-Nitro-L-arginina metil ester

ml - mililitro

NFAT -fator nuclear de ativação de células T

nm - nanômetro

NOD - domínio de ligação de nucleotídeo oligomerizado

Pred - prednisolona

RAGE - receptor de AGE

sc. - subcutâneo

t-bet - fator regulador de transcrição de células TH₁

TRL - receptor do tipo TOLL

TUNEL – “Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling”

v.o.- via oral

1 INTRODUÇÃO

1.1 Glicocorticoide

1.1.1 Histórico

Glicocorticoides são hormônios esteroides com ação anti-inflamatória produzidos pela glândula adrenal. É possível achar referências à existência dessa glândula desde os tempos bíblicos. Exemplo disso é a descrição na Bíblia dos irmãos gêmeos monozigóticos Esau e Jacó que possuíam características diferentes, sendo um excepcionalmente forte e hipertricrose capilar, possíveis sintomas de hiperplasia congênita da adrenal, enquanto o outro tinha características normais. No livro “Search the Scriptures”, o professor Robert Benjamin Greenblatt discute que os hebreus tinham o conhecimento da glândula adrenal e seus distúrbios (GREENBLATT RB, 1977). Já na antiga Grécia, o físico Claidius Galenus (130 - 201 dC) descreveu o órgão com maiores detalhes, e seus estudos foram base para a medicina europeia por centenas de anos. Dá-se crédito do descobrimento e descrição da glândula adrenal é dado ao professor e anatomista Bartholemeus Eustachius (1520 – 1574) que analisou diversos parâmetros anatômicos da glândula em placas de cobre, porém, seus trabalhos só foram publicados nove anos após sua morte, em 1783 por Giovanni Lancisi, seu sucessor.

Desde então diversos anatomistas, físicos e médicos descreveram estruturas e possíveis funções da adrenal, mas somente em 1805, Baron George Cuvier (1769-1832) publicou as diferenças estruturas da medula e do córtex da adrenal (WELBOURN, 1990). Apesar de, na época, já se saber que o órgão produzia um “suco” heterogêneo, somente em 1852 o suíço Rudolf Albert von Kölliker (1817-1905) descreveu que as substâncias excretadas pelas diferentes regiões da adrenal eram fisiológica e funcionalmente distintas. Charles-Édouard Brown-Séquard (1817 – 1894) descobriu que ao retirar ambas as adrenais de um animal, esse morria em poucas horas, porém, se fosse retirada apenas uma das adrenais, esse sobrevivia por mais tempo, apesar de também vir a óbito. Com esse experimento ele concluiu que as “substâncias excretadas” eram essenciais ao animal. O termo hormônio (do grego *hormao*, que significa substância que inicia, urge e estimula), associado ao

excretado, só foi sugerido por Sir William Bate Hardy de Cambridge em 1905 (adrenaltumors.org).

Em 1929, Edward C Hensch observou que pacientes com problemas reumáticos tinham seus sintomas aliviados durante a gestação ou após cirurgias. Dessa forma ele pode inferir que alguma substância antirreumática era liberada nessas condições. No ano seguinte, Philip S Kendall isolou seis substâncias associadas a glândula adrenal de bovinos e as identificou com as letras A a F e não tardou a identificar atividades fisiológicas dos compostos A (11-dehidrocorticosterona) e E (cortisona).

Em experimento com modelo de doença de Addison (doença na qual o paciente tem suas adrenais pouco funcionais, produzindo quantidades de hormônio inferiores às necessárias) foi observado uma divergência dos resultados obtidos em modelo animal dos resultados obtidos em pacientes tratados com o Composto A. Por isso, as atenções foram voltadas então para o composto E (HENCH PS, 1999).

Durante a Segunda Guerra Mundial acredita-se que os alemães usaram corticosteroides para que pilotos voassem em altas altitudes sem sofrerem hipóxia. Já em 1942, Lewis Sarett, químico da companhia Merck, após trabalhar por 3 meses no laboratório de Kendall voltou para a empresa focado em desenvolver o Composto E sintético, uma vez que o rendimento da extração do composto a partir da glândula era muito baixo (no máximo 500 mg de cortisona por cada 35,4 kg de adrenal). Esses resultados promoveram a publicação o artigo de Sarret com os 37 passos para a síntese de 21-monoacetato de 4-pregnene-17(b),21-diol-3,11,20-triona (acetato de cortisona) a partir de ácido desoxicólico (um ácido biliar), publicado em 1946 (SARETT LH, 1946). A substância apresentou excelentes resultados em trinta diferentes pacientes na Clínica Mayo em estudo feito em 1948 e no ano seguinte. Hensch resolveu dar ao Composto E o nome genérico de cortisona (a partir de corticosterona) para não haver confusão com a vitamina E (SAENGER AK, 2010).

Em 1948, o então denominado composto E foi injetado em uma mulher de 29 anos que sofria de severas dores reumáticas e após apenas dois dias a paciente teve alta. Dois anos após esse episódio Kendall e Hensch dividiram o Prêmio Nobel de Fisiologia e medicina com Tadeu Reichstein, que isolou independentemente hormônios do córtex da adrenal (SAENGER AK, 2010).

1.1.2 Mecanismos de ação

Os glicocorticoides (GCs) são importantes reguladores de processos inflamatórios, proliferação celular e crescimento (BEATO M e KLUG J, 2000). São produzidos diariamente pelo córtex das glândulas adrenais em concentrações diferentes ao longo do dia. Em caso de uma injúria ao organismo, incluindo inflamação, dor, infecção ou estresse mental, há a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (antigo eixo hipófise pituitária adrenal ou HPA). Esse estímulo causa a excitação do hipotálamo, que responde através da liberação de Hormônio Liberador de Corticotrofina (do inglês “corticotrofine release hormone” ou CRH). CRH, em seguida, age sobre a hipófise anterior para induzir a síntese e liberação de hormônio adrenocorticotrófico (do inglês “Adrenocorticotropic hormone” ou ACTH). ACTH, por sua vez estimula o córtex adrenal a liberar GC na forma de cortisol, em humanos ou corticosterona, em roedores (WITORSCH RJ, 2016).

Uma vez no sangue, o cortisol (ou a corticosterona) é transportado para os órgãos alvo, onde provoca inúmeros efeitos metabólicos, incluindo o aumento dos níveis de glicose no sangue, a estimulação da gliconeogênese no fígado, e a mobilização de aminoácidos e ácidos graxos (DUŠKOVÁ M *et al*, 2015).

Uma vez dentro da célula, os GCs exercem as suas funções ao ligarem-se a seu receptor intracelular, o receptor de glicocorticoide (GR), que é um fator de transcrição pertencente à superfamília de receptores nucleares e possui 777 aminoácidos (WHITFIELD GK, 1999). O GR reside predominantemente no citoplasma no seu estado inativo e tem sua estabilidade promovida por um complexo multimérico constituído por duas moléculas Hsp90 e outras como imunofilinas p59 e calreticulina (VANDEVYVER S, DEJAGER L e LIBERT C, 2012). Após o acoplamento do agonista, o complexo multimérico se solta do GR e esse sofre alterações conformacionais que o permite migrar para o núcleo, esse fenômeno é denominado “translocação nuclear induzida pelo ligante”. No núcleo, o GR é capaz de regular positivamente vários genes, como IL-10, anexina-1 e κ B através da ativação da transcrição pela ligação direta de homodímeros de GR a regiões promotoras do DNA denominadas elementos de resposta a GR (GREs) (SCHMID W, 1989). Essa ligação exige interação entre um grupo de cinco aminoácidos, conhecidos como dimerizadores ou “D loop” localizado dentro do domínio de ligação e é essencial para a ativação transcricional (DAHLMAN WK *et al*, 1999).

A ligação entre GR e seu agonista pode também promover uma modulação negativa de genes como o fator nuclear das células T ativadas (NFAT), fator de transcrição T box específica de Th1 (T-bet), GATA3, NF- κ B e AP-1 (REILY MM, 2006). Estes dois últimos, podem sofrer modulação negativa por interação proteína-proteína entre os mesmos e o GR (RAO NA *et al* 2011 e KARMAKAR S, JIN Y e NAGAICH AK, 2013).

Além disso, os GCs reduzem o número de células inflamatórias, incluindo eosinófilos, linfócitos B e T, mastócitos e células dendríticas. Esse efeito dá-se através da supressão na produção de mediadores quimiotáticos e moléculas de adesão importantes para a migração das células inflamatórias. Acredita-se que os GC modulam a população dos mastócitos, através da inibição da sobrevivência das mesmas, pela redução do conteúdo de fatores de sobrevivência celular e/ou pela indução direta de apoptose (FINOTTO S, MEKORI AY E METCALFE DD, 2005; VAN LAETHEM F *et al* 2001 e NITTOH T *et al*, 1998).

1.1.3 Uso de glicocorticoides em clínica

Sendo os GC moléculas anti-inflamatórias, após o desenvolvimento da molécula sintética, seu uso na clínica se mostrou ímpar, insubstituível. Em concentrações farmacológicas, GCs têm a capacidade de suprimir diversos marcadores inflamatórios, o que faz dele um agente anti-inflamatório muito potente (IRVIN C *et al* 2014). Assim, numerosas desordens autoimunes, inflamatórias e alérgicas, tais como asma, artrite reumatoide, colite ulcerativa, e rinite alérgica, são muitas vezes tratadas com GC sintético (RHEN T, 2005), incluindo a dexametasona (Dexa) e/ou prednisolona (Pred).

Apesar de sua excelente eficácia na terapêutica, o uso de GCs é frequentemente restrito devido aos seus efeitos adversos, dentre eles, o diabetes, a osteoporose, a hipertensão arterial e a atrofia muscular (MCDONOUGH AK, CURTIS JR e SAAG KG, 2008). Além disso, os GCs podem aumentar a expressão de hormônio de crescimento (do inglês “growth hormone” ou GH) na hipófise (KIM E *et al*, 2008), induzir resistência periférica à insulina (YUEN KC, CHONG LE e RIDDLE MC 2013) e resistência a GC (SWIERCZEWSKA M *et al*, 2013), podem também retardar o desenvolvimento sexual secundário durante a puberdade (WOMMACK JC, SALINAS A e DELVILLE Y, 2005), inibir a reabsorção de cálcio nos túbulos

renais e absorção de cálcio no intestino (MANGOS GJ *et al* 2003) e aumentar a glicemia.

Os GC, como são hormônios hiperglicemiantes, podem promover um aumento de formação de produtos finais da glicação avançada (do inglês “advanced glycation end-products” ou AGEs) (BEAUDRY JL *et al* 2013), como por exemplo a pirralina e pentosidina que podem danificar as células através da modificação de estruturas intracelulares, prejudicando a transcrição gênica, interagindo com proteínas da matriz extracelular, afetando a sinalização e modificando proteínas ou lipídeos sanguíneos, prejudicando processos inflamatórios (BARBOSA J, OLIVEIRA S e TOJAL-SEARA J, 2008). Além disso, o tratamento com GC pode aumentar a expressão tanto de receptores de AGEs como o RAGE (DJERBI N *et al*, 2013) e a galectina-3 (Gal-3) (MALDONADO CA *et al*, 2011),)

GCs sintéticos também têm a habilidade de mimetizar os GCs endógenos, por isso são capazes de ativar a retroalimentação negativa, consequente da liberação de GC para a corrente sanguínea (SAKUMA I *et al* 2016) Dessa forma, pacientes que recebem GC por longos períodos e interrompem abruptamente o seu uso podem desenvolver um quadro denominado “pseudo-Cushins” (patologia semelhante à doença de Cushins, cujos pacientes apresentam disfunção no eixo HPA), até o próprio organismo ter a capacidade de voltar a produzir o cortisol (LINDHOLM J, 2014)

Contudo, muitos quadros infecciosos justificam o uso da molécula, como em pacientes recém transplantados, sendo crucial para evitar a progressão das doenças e rejeição de órgãos. A explicação mais plausível para esse efeito é a redução da expressão de moléculas de adesão, como a molécula de adesão intracelular (do inglês “intracellular adhesion molecule” ou ICAM, que impedem a diapedese de células da imunidade inata, além de reduzir o número de células como linfócitos B e T e células residentes teciduais, incluindo células dendríticas e mastócitos (FINOTTO S, MEKORI AY E METCALFE DD, 2005; VAN LAETHEM F *et al* 2001 e NITTOH T *et al*, 1998).

1.2 Mastócitos

1.2.1 Histórico

Os estudos com patologias envolvendo mastócitos foram iniciadas antes mesmo dessas células serem caracterizadas. Foi em 1869, Charles Blakely teve a ideia de fazer um teste cutâneo em si mesmo para avaliar se a febre que ele costumava apresentar estava relacionada ao pólen.

Em 1882 então, Paul Ehrlich apresentou em sua tese de doutorado as aplicações das colorações de tecidos humanos. Entre suas considerações ele apontou uma célula alarina positiva, chamando-a de “mastzellen” (*mast* em alemão dá a ideia de engorda, sucção), pois acreditava que se tratava de uma célula com propriedades nutricionais, visto que possuía muitos grânulos. Ele ainda enfatizou a diferentes substâncias com propriedades metacromáticas dos grânulos quando corados com anilina e foi o primeiro a publicar um desenho esquemático dessa célula (Figura 1) (EHRlich P, 1877). Ele recebeu um prêmio Nobel em 1908 por esse trabalho.



Figura 1. Desenho esquemático de mastócitos feito por Paul Ehrlich em 1877 demonstrando a estrutura e localização dos então conhecidos como *mastzellen*.

Somente após 33 anos da confirmação da hipótese de Charles Blakely, Portiel e Richet introduziram o termo anafilaxia para descrever os sintomas observados em cachorros que foram injetados previamente com extrato de tentáculos de *Physalia* (celenterado comumente conhecido como caravela) (PORTIER P e RICHET C, 1902). Richet estudou os efeitos tóxicos da *Physalia* e

recebeu um prêmio Nobel em 1913 por esse e outros estudos envolvendo respostas relacionadas ao mastócito.

Paralelamente a isso, Clement von Pirquet apresentou o termo *alergia* em 1906 após observar uma reação a que chamou de anticorpo de interação com patógeno (*pathogen-interacting antibody*) em diversos pacientes após administração de uma segunda dose de vacina ou soro de cavalo antitoxina de varíola (SILVERSTEIN AM, 2000). Essa reação sabe-se hoje, é um dos principais mecanismos de sensibilização e ativação para desgranulação de mastócitos.

Estudos desenvolvidos por Landsteiner, Ishizaka e Campbell permitiram concluir que anticorpos polivalentes, mas não monovalentes, conseguiam iniciar uma reação alérgica, e que a agregação de dois ou mais anticorpos em um único complexo antígeno anticorpo era suficiente para iniciar uma reação anafilática cutânea passiva (LANDSTEINER K, 1924 e ISHIZAKA K e CAMPBELL DH, 1959). Foi somente em 1967 que Ishizaka, K e Ishizaka, T identificaram o anticorpo γ E (IgE), responsáveis por apenas 0,005% do total de imunoglobulinas do organismo (ISHIZAKA K, ISHIZAKA T, 1967).

1.2.2 *Maturação e características morfológicas*

Mastócitos são importantes células do sistema imune derivadas de células pluripotentes hematopoiéticas e estão distribuídos pelo corpo, principalmente na interface entre o indivíduo e o ambiente, incluindo o trato gastrointestinal, pele e epitélio respiratório (GALLI SJ e TSAI M, 2010 E METCALFE DD e BOYCE JA 2006) além de serem encontrados no sistema nervoso central, vasos e retina (DA SILVA EZ, JAMUR MC e OLIVER C, 2014). Em roedores, os mastócitos estão presentes nas cavidades peritoneal e torácica (JAMUR MC, 2005).

Apesar de não se saber muito sobre as etapas de diferenciação e maturação dos mastócitos, sabe-se que esses processos estão relacionados com a interleucina-4 (IL-4) e a ligação e ativação do receptor c-kit, presente nas membranas dos mastócitos ao ligante Fator de Célula Tronco (do inglês “Stem Cell Factor” ou SCF) presente no tecido onde a célula irá residir. A sobrevivência e diferenciação dos mastócitos em tecidos mucosos envolve a participação tanto de SCF quanto de IL-3, enquanto que nos tecidos conjuntivos, está envolvido apenas ao SCF (VAN DER KLEIJ HP *et al* 2004).

Para migrar para o tecido alvo, as células progenitoras de mastócitos necessitam de que integrinas, moléculas de adesão, citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento tenham seus efeitos coordenados. Os progenitores de mastócitos expressam integrinas $\alpha 4\beta 7$ que se ligam às VCAM-1 do endotélio, permitindo a sua saída da circulação. Essas células também expressam CXCR2, que promove sua migração para o intestino delgado. Já no caso dos pulmões, não é comum encontrarmos células progenitoras de mastócitos em condições normais, mas em casos de inflamação do endotélio respiratório induzida por antígeno, essas células são recrutadas pela interação de integrinas $\alpha 4\beta 7$ e VCAM-1 do endotélio acompanhada da ligação de CCR-2 e CCL-2. Além disso, quando mastócitos maduros desgranulam, também são liberados fatores quimiotáticos para progenitores de mastócitos (COLLINGTON SJ, WILLIAMS TJ e WELLER CL, 2011). Após migrarem, os mastócitos mantêm sua sobrevivência principalmente pela interação de seus receptores c-kit com SCF presente no tecido alvo.

Os mastócitos em geral contêm 50 a 200 grânulos em seu citoplasma que estocam mediadores inflamatórios como histamina, heparina, diversas citocinas, sulfato de condroitina e proteases neurais, dependendo do seu fenótipo (DA SILVA EZ, JAMUR MC e OLIVER C, 2014). São descritos dois fenótipos de mastócito em roedores que são facilmente diferenciados pelo corante Azul de Alcian/ Safranina: o de tecido mucoso (“mucous mast cell” MC_M) que expressam sulfato de condroitina, o que faz com que sejam coradas pelo Azul de Alcian e o de tecido conjuntivo (“connective tissue mast cell” MC_{CT}) que expressam na sua maioria heparina, o que faz com que a célula seja corada pela Safranina (WANG ZH, 2001). Os mastócitos estão envolvidos na regulação de diversos processos patológicos, uma vez que constituem uma das primeiras defesas do organismo contra antígenos por sua localização na pele e nas mucosas (BULFONE-PAUS S e BAHRI R 2015).

1.2.3 Mecanismos de desgranulação

Os mastócitos possuem a capacidade de liberar uma variedade de mediadores, quer sejam pré-formados e armazenados em grânulos, tais como a histamina e as proteases, ou sintetizados tais como eicosanoides, citocinas e quimiocinas (MOON TC *et al* 2010 e GALLI SJ e TSAI M, 2010). O processo de desgranulação pode advir de uma resposta a produtos microbianos através de

receptores de reconhecimento de padrões, que incluem os receptores do tipo Toll (TLR) e do domínio de ligação de nucleotídeos oligomerizados (NOD) (DAWICKI W e MARSHALL JS, 2007). Muitos destes receptores podem atuar no receptor de alta afinidade a IgE, FcεRI, para aumentar substancialmente as respostas dos mastócitos a antígenos ou alterar o padrão de resposta de modo a induzir a produção de citocinas e desgranulação (ANDRADE MV *et al* 2011).

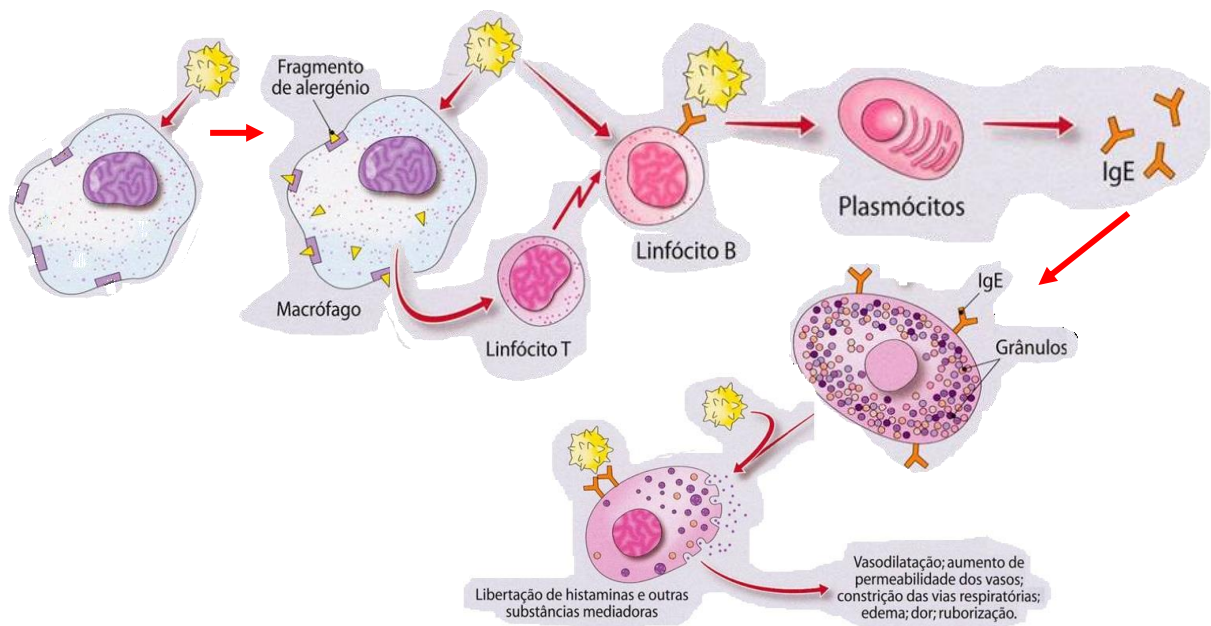


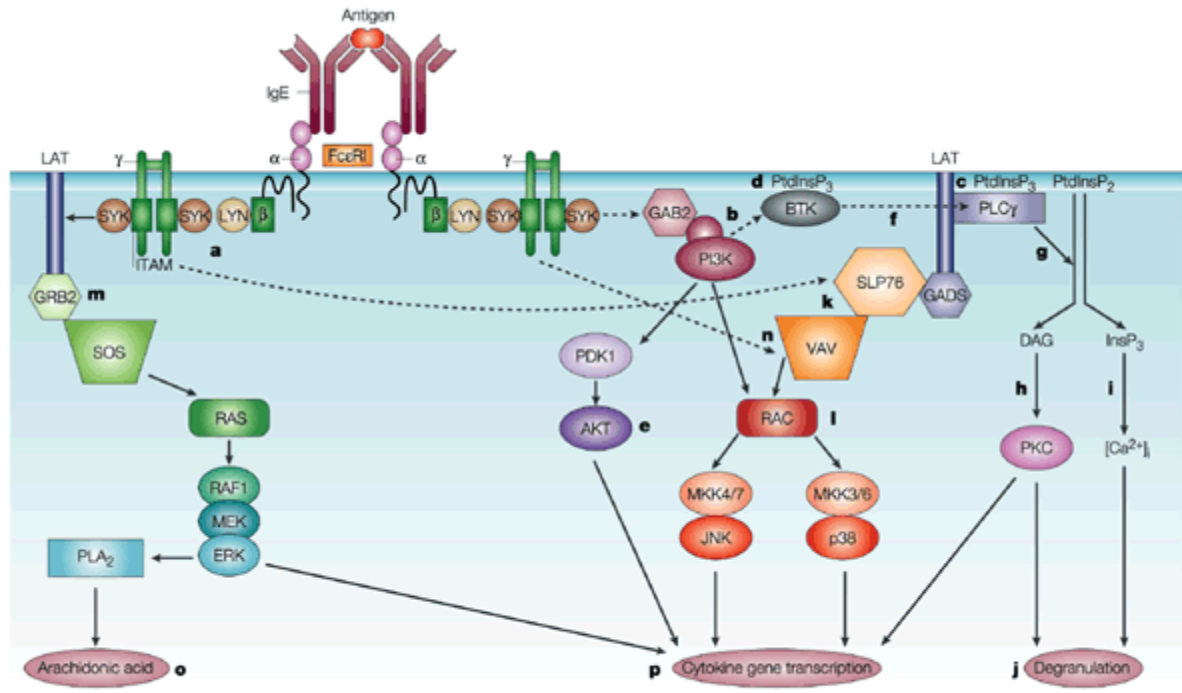
Figura 2: Imagem esquemática de sensibilização e ativação de mastócitos, no qual há um primeiro contato com alérgeno, permitindo a formação de IgEs específicas que se ligarão em receptores de alta afinidade FcεRI nos mastócitos. Em segundo contato com alérgeno há a ligação desses com as IgEs já acopladas aos mastócitos que resultarão na desgranulação das células.

No caso de doenças associadas a ativação do sistema imune adaptativo, por exemplo, anafilaxias, urticárias, asma e helmintíases, há inicialmente uma apresentação de um agente externo, normalmente promovido por células dendríticas ou macrófagos, a um linfócito B, que é ativado por linfócito Th₂. Os linfócitos B produzem altos níveis de IgE antígeno específico. Essas IgEs se ligam a receptores FcεRI na membrana de mastócitos, e esse processo é denominado sensibilização. Havendo um novo contato com o antígeno, as porções dos peptídeos específicos se

ligam à IgEs presentes em FcεRI culminando em uma ativação cruzada destes receptores, resultando na desgranulação (GILFILLAN AM e BEAVEN MA, 2011).

Ao nível molecular, a desgranulação ocorre inicialmente pela ativação de Syk, uma proteína cinase que se auto fosforila após ser recrutada para os imunoreceptores de ativação baseado em tirosina (do inglês “Immunoreceptor tyrosine-based activation motif” ou ITAMs). Syk fosforilada é capaz de fosforilar o ativador de ligante de células T (LAT) e ativador de ligante de células não-T (NLAT). LAT é capaz de fosforilar fosfolipase C γ que hidrolisa fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP₂) em inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG). IP₃ e DAG são mensageiros secundários, sendo que IP₃ é capaz de recrutar cálcio do retículo endoplasmático para o citosol (HITOMI T *et al* 2004), enquanto DAG irá ativar a proteína cinase C (PKC) que, juntamente com o cálcio, promove a desgranulação dos mastócitos (GALLI SJ, 2010) e a translocação de NF κ B ao núcleo da célula, o que resulta na transcrição de citocinas como IL-6, TNF α e IL-13.

Paralelo a isso, a ativação de FcεRI ativa Fyn, que é uma Src cinase. Fyn é capaz de regular a desgranulação de mastócitos por ativar PI3 cinase, que ativa Akt e produz PIP₃ (KALESNIKOFF J e GALLI SJ, 2008). Esses processos são capazes de ativar mTOR, que está envolvido na quimiotaxia de mastócitos e na produção de citocinas (SIBILANO R, FROSSI B e PUCILLO CE, 2014). Após desgranular, os mastócitos sintetizam os mediadores e produzem novos grânulos (Figura 3) (BRADDING P, 1999).



Nature Reviews | Immunology

Figura 3: Desenho esquemático da desgranulação de mastócitos (Wernersson S e Pejler, 2014)

Como explicitado acima, mastócitos também possuem receptores do tipo TRLs. No caso de um receptor desse tipo ser ativado, ocorre a translocação de NFκB para o núcleo, o que culmina na transcrição de citocinas (BASU S e FENTON MJ, 2004). Se, por exemplo TRL4 for ativado por LPS, há produção de citocina, sem desgranulação, porém se TRL2 for ativada por peptideoglicano ocorre tanto a produção de citocinas quanto desgranulação (SUPAJATURA V *et al* 2002).

Outros ativadores de desgranulação de mastócitos, como neuropeptídeos carregados positivamente (por exemplo, a substância P e neuropeptídeo Y), aminas (por exemplo, compostos 48/80 e poliaminas naturais) ou complemento catiônica através de proteínas de ligação a GTP Trimétrica inespecífica (proteínas Gi) são capazes de levar a desgranulação através de um processo independente de FcεRI, mas dependente de outros receptores presentes na membrana. O fosfolípido inositol clivado por fosfatidilinositol 3-quinase ou fosfolipase C promove liberação de cálcio ao meio intracelular, promovendo a desgranulação de mastócitos (FERRY X *et al* 2002). Esse processo desempenha um papel importante na inflamação de neurônios, lesão tecidual por peptídeos de veneno ou de produtos farmacêuticos, e doenças que envolvem grande ativação da cascata do complemento no sangue (MITSUHIRO U *et al* 2015)

1.2.4 Participação dos mastócitos em doenças

Há muitos anos os mastócitos eram associados exclusivamente às doenças alérgicas, contudo, nos últimos anos as descobertas acerca de outras enfermidades as quais essas células estão relacionadas vêm crescendo exponencialmente. Por exemplo, os mastócitos estão sendo investigados por estarem relacionados a dores de cabeça e dores em geral, por participarem de processos dependentes de TNF (GU Y *et al* 2015). Também existem pesquisas acerca da participação dos mastócitos na progressão de cânceres, por promover angiogênese, invasão tumoral e supressão imune (HODGES K *et al* 2012). Além disso, os mastócitos estão intimamente envolvidos em doenças inflamatórias pulmonares como asma, fibrose e hipertensão pulmonar por causar o remodelamento tecidual (VIRK H, ARTHUR G e BRADDING P, 2016) e, mais recentemente, foi descoberto a relação entre essas células e doenças autoimune como a esclerose múltipla. Foi demonstrado tal relação pela expressão aumentada de genes de mediadores químicos e citocinas inflamatórias (P. CONTI e D. KEMPURAJ, 2016).

A crescente evidencia da participação dos mastócitos em doenças requer uma maior investigação para o controle da população e atividade dessas células. O tratamento mais comumente usado para alergias são os anti-histamínicos, que simplesmente bloqueiam receptores de histamina no organismo, evitando assim os efeitos de sua liberação. Outros fármacos menos usuais são a Omalizumab, que reduz a IgE livre no sangue (YALCIN AD 2015), administração de antígeno em doses crescentes a curto espaço de tempo, denominado dessensibilização (SHALIT M e LEVI-SCHAFFER F 1995) e administração de GCs tópico ou oral.

O tratamento com GC no combate a alergias se mostra muito efetivo pois é capaz de reduzir os efeitos a médio prazo, uma vez que essa classe de medicamentos pode induzir apoptose de algumas células que estariam envolvidas no processo alérgico, inclusive os mastócitos (VAN LAETHEM F *et al* 2001 e NITTOH T *et al*, 1998)

Em nosso laboratório, observamos que o aumento nos níveis circulantes de GCs em animais diabéticos desencadeia uma redução no número tanto de mastócitos conjuntivos, presentes nas cavidades pleural e peritoneal, ao induzir apoptose dos mesmos (DIAZ BL, 1996); quanto de mastócitos mucosos, localizados

no intestino, de forma dependente da redução nos níveis teciduais de IL-3 (fator de sobrevivência para mastócitos) e não SCF, (CARVALHO VF, 2009).

1.3 Produtos finais da Glicação Avançada

1.3.1 Definição e mecanismos de formação

Os produtos finais da glicação avançada, do inglês “advanced glycation end-products” (AGEs) são moléculas formadas naturalmente no organismo. A glicação não-enzimática envolve a reação de condensação do grupo carbonila de aldeídos de açúcar com o grupo de amino livre da porção N-terminal de proteínas, resultando em primeiro lugar, na rápida formação de uma base de Schiff, que é um produto instável. A ligação covalente do complexo proteína-açúcar é formada através de uma série de reações químicas conhecidas como reações de Maillard (SINGH R, BARDEN A e MORI T. BEILIN, 2001).

Em seguida, ocorre um rearranjo para formação de produtos mais estáveis, então denominados produtos de Amadori (SCHALKWIJK C e MIYATA T, 2012). A glicose derivada do produto de Amadori reage com ele mesmo ou com aminas primárias, tais como a ϵ -amino-lisina e sofre outras reações para formar AGEs (ANSARI N e DASH D, 2013). Estes podem inativar proteínas ou modificar suas atividades biológicas, levando a complicações micro e macrovasculares da *Diabetes mellitus*, por exemplo. Além disso, a formação dos AGEs nas proteínas da matriz extracelular e na lipoproteína de baixa densidade com subsequente deposição de células inflamatórias na parede do vaso pode contribuir para a resposta inflamatória e formação de placa de ateroma (ZAFAR H *et al* 2012). Devido ao papel potencial dos AGEs em algumas doenças como diabetes e desenvolvimento de placa de ateroma, pesquisa por fármacos que inibem a formação destes produtos da glicação ou de suas consequências biológicas é de particular interesse.

Já foram descritos dois receptores do AGEs, o RAGE (MALMSTEDT J *et al* 2016) e a Galectina-3 (MENINI S *et al* 2016) que são capazes de iniciar um sinal intracelular e perturbar algumas funções intracelulares. Foi demonstrado que a ativação desses receptores é capaz de induzir apoptose de fibroblasto (LI DX *et al* 2014) e de células de Jurkat (XUE J *et al* 2013). Além desses, já foram descritos

outros receptores dos AGEs como AGE-R1 (oligossacaril transferase-48), AGE-R2 (fosfoproteína 80K-H) e receptor sequestrante de macrófago do tipo I e II, porém não se têm evidências de transdução de sinal intracelular destes quando expostos aos AGEs (STITT AW, BUCALA R e VLASSARA H, 1997).

1.3.2 Moléculas reguladoras e fármacos

Existem uma série de moléculas reguladoras dos AGEs e provavelmente a mais investigada é a aminoguanidina (AG). Essa molécula é uma hidrazina capaz de prevenir a formação dos AGEs pois reage com grande parte de compostos precursores de glicação que ainda não estão ligados às proteínas como 3-deoxyglucosona (YAN SD *et al* 1994). Porém, a AG também é capaz de inibir óxido nítrico sintase (NO sintase), e como o óxido nítrico é um componente muito importante para diversos processos metabólicos, a AG é vista como uma candidata ruim para clínica como inibidor de AGE (WILKINSON-BERKA JL *et al* 2002). Apesar de haverem outras moléculas capazes de inibir os AGEs como piridoxamina, somente a AG foi usada no presente estudo por ser de mais fácil acesso.

1.4 Justificativa

Acreditamos que a redução do número de mastócitos induzidos por GC esteja relacionado ao sistema AGE e seus receptores, uma vez que já se sabe que o tratamento com GC pode aumentar a expressão tanto de RAGE (DJERBI N *et al*, 2013) quanto de Gal-3 (MALDONADO CA *et al*, 2011), e que a ativação de receptores dos AGEs podem induzir apoptose de mastócitos (LI DX *et al* 2014).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo verificar a participação dos produtos finais de glicação não enzimática (AGEs) na redução no número e reatividades de mastócitos induzida pelo tratamento prolongado com glicocorticoide.

2.2 Objetivos Específicos

- i) Avaliar o papel dos AGEs sobre o efeito dos glicocorticoides em reduzir número e reatividade de mastócitos;
- ii) Avaliar o papel dos AGEs sobre o efeito dos glicocorticoides em induzir apoptose de mastócitos;
- iii) Avaliar o papel dos AGEs sobre efeitos metabólicos e de imunossupressão dos GCs
- iv) Quantificar albumina glicada (frutosamina) e glicemia de animais tratados com glicocorticoide;
- v) Avaliar se os GCs podem regular a expressão dos AGEs em mastócitos
- vi) Avaliar o efeito de inibidores seletivos de RAGE e Gal-3 sobre a mastocitopenia induzida por GCs

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar e camundongos swiss machos de peso entre 250 e 300 g e 18 e 20 g, respectivamente. Os animais foram obtidos do Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz. O procedimento experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Laboratório (CEUA) da Fundação Oswaldo Cruz, licença LW-23/11. Os animais foram submetidos a ciclo de claro/escuro de 12 horas e tiveram livre acesso à água e ração.

3.2 Esquema de tratamento

Aos animais, foram administrados dexametasona ou prednisolona (0,1 mg/kg; .c.) uma vez ao dia durante 21 dias. Em alguns animais, foram coadministrados a partir do quarto dia das aplicações do glicocorticoide, aminoguanidina (AG) (50 ou 250 mg/kg, v.o.), L-NAME (30 mg/kg; v.o.), GSC-100 (1,0 mg/kg; v.o.) ou FPS-ZM1 (1 mg/kg; i.p.) uma vez ao dia, diariamente, como mostra a figura 4 abaixo.



Figura 4: Esquema de tratamento dos animais durante os experimentos. Ratos machos Wistar ou camundongos Swiss foram tratados com glicocorticoide por 21 dias e, alguns animais, a partir do quarto dia foram tratados conjuntamente com as drogas acima descritas. * referente às drogas: Aminoguanidina, L-NAME, GCS-100 e FPS-ZM1.

3.3 Contagem de mastócitos

3.3.1 Nas cavidades pleural e peritoneal

O espaço pleural de ratos ou no peritônio de camundongos foi lavado com 3 ml de uma solução de HBSS heparinizado (20 UI/ml). No caso dos camundongos o lavado foi centrifugado a 150 g por 6 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso com 300 µl com a mesma solução de lavagem. Os mastócitos foram contados em câmara de Neubauer, após diluição com corante azul de toluidina (1:10).

3.3.2 No mesentério

Após ser lavado o peritônio dos camundongos, foi feita uma retirada do intestino delgado e depositado com as lamelas abertas em uma lâmina limpa. As lamelas foram fixadas com uma solução de paraformaldeído 4% e sacarose 4% por uma hora e lavado com PBS. Após secarem, os intestinos foram removidos e as lamelas foram coradas com May Grunwald por 5 minutos, lavados com água por 2 minutos e contra corado com corante de Giemsa diluído dez vezes por 15 minutos. As lâminas foram secas e analisadas em microscópio de luz. Para esta análise, foram contados no mínimo 6 campos/ lamela de mesentério, tendo sido contados 3 lamelas por animal, em objetiva de 200x. Foi analisada a área de cada campo com auxílio do programa Image Pro-Plus 6,2 e os resultados foram expressos como mastócitos/ nm².

3.4 Isolamento de mastócitos

Após morte dos animais em câmara de CO₂, o peritônio dos ratos foi lavado com 20 ml de HBSS sem cálcio com heparina (20 UI/ml). O lavado recolhido foi centrifugado por 6 minutos à 150g à 4°C. O precipitado foi ressuspenso com 1 ml de HBSS sem cálcio com BSA (1 mg/ml). As células foram transferidas lentamente para um gradiente contínuo de Percoll. O gradiente foi centrifugado durante 25 minutos à 150g a 20°C. O anel formado foi retirado com pipeta Pasteur lentamente juntamente com o sobrenadante, deixando apenas o precipitado. Esse foi ressuspenso com 20 ml de HBSS sem cálcio com BSA para que o Percoll fosse lavado. Foi então

centrifugado à 150g por 6 minutos com temperatura de 10°C e o precipitado foi ressuspenso com 1ml de HBSS com cálcio.

3.5 Ativação de mastócitos in vitro

Após isolados, os mastócitos foram plaqueadas em placa de 48 poços em uma densidade de 10^5 células por poço. Após aderirem por 1h, os mastócitos foram sensibilizados com IgE anti-DNP (0,5 µg/ml) durante 1h. Em seguida, as células foram estimuladas com DNP (0,5 µg/ml) durante 1 hora. Os controles foram desafiados apenas com HBSS com cálcio. Como estímulo não-imunológico, mastócitos isolados foram estimulados com composto 48/80 (0,05 µg/ml) durante 1 hora in vitro. Para aferir a quantidade total de histamina foi feito um poço extra e acrescentado HCl 0,8N. Essa quantidade que permite lisar totalmente as células. Após as estimulações, os sobrenadantes foram recolhidos e estocados a -20°C para posterior quantificação de histamina.

3.6 Quantificação de histamina

As amostras foram descongeladas e diluídas a 0,2 ml de amostra para 1,8 ml de HCl 0,1 normal (N), em seguida foi acrescentado de 0,8 ml de NaOH a 0,8N em cada amostra e, por fim, foi pipetado 0,2 ml substrato de OPT (o-ftaldialdeído). Após 4 minutos de incubação, a reação foi interrompida com 0,4 ml de HCl 3N e a fluorescência emitida foi mensurada através da utilização de um espectrofluorímetro com excitação de 360 nm e emissão a 450 nm. Para fins de obtenção de uma quantidade específica da liberação de histamina, foi feita uma curva padrão com as concentrações de 0, 5, 10, 30, 50, 75 e 100 µg/ml de histamina padrão em HCl a 0,1N.

3.7 Análise macro e microscópica de atrofia muscular

Após serem mortos em câmara de CO₂, foi retirado os músculos gastrocnêmio localizados nas panturrilhas dos animais. O músculo da pata esquerda foi submerso em solução de formol 4% por 3 dias e então colocados em álcool 70%. As amostras passaram, então pelo processo de inclusão e foram parafinizados. Os blocos foram cortados em espessura de 4 µm aproximadamente e

corados com hematoxilina e eosina. As lâminas foram analisadas quanto a área de cada fibra muscular em microscópio de campo claro.

O músculo da pata direita foi retirado e pesado. Foi retirado também a tíbia da mesma pata e feita a medida. Foi analisado então o quociente do peso (g) do músculo pelo tamanho (cm) da tíbia.

3.8 Western blot

3.8.1 Géis

Foi usado o equipamento da BIORAD para a técnica. Após devidamente limpos, os vidros de 1,5 mm de espessura foram montados para polimerização dos géis. Inicialmente foram colocados os géis de separação de 12% (1,9 ml de acrilamida 30%, 850 µl de Tris 1,5M, 350 µl de SDS 1%, 280 µl de glicerol, 1,94 ml de água MilliQ, 3 µl de persulfato 10% e 20 µl de TEMED para cada gel), após 40 minutos para polimerizar, em temperatura ambiente, foi aplicado o gel de empacotamento de 4,5% (375 µl de acrilamida 30%, 690 µl de Tris 500mM, 270 µl de SDS 1%, 1,4 ml de água MilliQ, 2,5 µl de persulfato 10% e 27 µl de TEMED para cada gel) e acrescentado o pente para formação dos poços. Os géis foram armazenados em temperatura de 4 °C até serem utilizados, cobertos com plástico filme.

3.8.2 Quantificação de proteína e preparo das amostras

Após os mastócitos serem isolados, eles foram centrifugados e retirado o sobrenadante. Para cada N, foi necessário fazer um pool de 3 animais, por isso, as células foram adicionadas em um único tubo e foi acrescentado 50 µl de solução de lise. Já as amostras com gastrocnemio retirados dos animais após serem mortos em câmara de CO₂ foram acrescentados 300 µl de solução de lise em gelo e processadas em homogeneizador (vortex) também em gelo.

Os produtos foram centrifugados a 1000 G por 10 minutos 4°C. Foram recolhidos os sobrenadantes e foram retirados 5 µl para quantificação de proteína em placa de 96 poços com fundo reto. A esses, foram acrescentados 200 µl de solução de BCA 1:49 de cobre 2+ (Cu²⁺): Ácido bicinconínico. A placa foi então

encubada por 15 minutos a 60 °C em abrigo de luz e foi lido a 562 nm de absorbância em espectrofotômetro.

As amostras foram então preparadas a 30 µg de proteína para cada 20 µl do volume final, acrescentado 10 µl de tampão amostra e acertado o volume com água MilliQ. Por fim, as amostras foram aquecidas a 95 °C por 5 minutos e armazenadas a -20°C. As amostras não utilizadas nessa etapa foram armazenadas em -80°C.

3.8.3 Corrida de eletroforese

Após devidamente limpas e montadas, foram acoplados os géis previamente preparados nas cubas de eletroforese. Foram acrescentados 1000 ml de tampão corrida devidamente preparado e só então foram retirados os pentes que moldaram os poços. As amostras foram então descongeladas e submetidas a um *spin* para que fossem bem homogeneizadas. Foi aplicado 20 µl de amostra em cada poço e 5 µl de padrão de peso molecular para guiar devidamente a corrida. Foram então retiradas as bolhas da porção final dos géis com uma seringa curva. A tampa contendo os eletrodos foi colocada com cuidado e foi programada uma corrida de 80 volts e 80 mA até as amostras alcançarem o gel de separação. A partir daí foi modificada a programação para 110 volts e 80 mA. O músculo retirado e os mastócitos isolados foram lisados em tampão RIPA. As amostras foram preparadas com tampão contendo azul de bromofenol e as amostras foram corridas em gel 12% acrilamida. A transferência foi feita em membrana de nitrocelulose e essas foram bloqueadas com albumina bovina (do inglês “bovine albumin” ou BSA) a 5% em TBST. Os anticorpos primários para RAGE e galectina-3 foram diluídos 1:500 e os anticorpos actina e GAPDH foram diluídos 1:1000, todos em TBST. Todos os anticorpos secundários foram diluídos 1:10 000 em TBST. As membranas foram reveladas no equipamento ODYSSEY®.

3.9 Quantificação de frutamina

Foi coletada uma amostra de sangue a partir da artéria aorta abdominal imediatamente após morte dos animais em câmara de CO₂ utilizando-se uma solução de salina heparinizada (400 UI/ml). As amostras de sangue foram centrifugadas (1000 g por 10 minutos) para separação do plasma. Os níveis

plasmáticos de frutamina foram avaliados através da técnica de espectrofotometria (LABTEST Kit) seguindo as recomendações do fabricante.

3.10 Medição de glicemia

Para análise da glicemia, foi coletado 10 µl de sangue da cauda dos animais. A medição foi realizada através de um glicosímetro (Johnson & Johnson), sendo a concentração expressa em mg/dl de sangue.

3.11 TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling)

A partir do lavado peritoneal dos animais com HANKs sem cálcio heparinizado, foi feita uma centrifugação a 150 G por 6 minutos a 4°C. A amostra foi ressuspensa com 10% do volume total recolhido do lavado. A partir desse, foi feita uma gota espessa em lâmina silanizada e delimitadas com caneta hidrofóbica. Após uma hora, as células já estavam aderidas e o excesso de meio foi retirado com cuidado por aspiração. As células foram fixadas com paraformaldeído 4% por uma hora e lavadas 3 vezes com PBS. A detecção de apoptose foi então feita com In Situ Cell Death Detection Kit, POD da Roche, catálogo nº 11 684 817 910, seguindo as recomendações do fabricante.

3.12 Silanização de lâminas

Lâminas fervidas com extran 5% em água destilada por 1 hora, foram limpas com água corrente por 20 minutos e limpas álcool e depois foram deixadas secar. As lâminas então foram embebidas em acetona por 3 minutos, depois em uma solução de silane 4% em acetona e, por fim, mergulhado 3 vezes em acetona. Após esse processo, as lâminas foram deixadas para secar em temperatura ambiente.

3.13 Análise de linfócitos circulantes

Para analisar o total de leucócitos foi homogeneizado 195 µl de Turk com 5 µl de sangue puncionado da cauda dos animais e contado em câmara de Neubauer.

Para avaliar as diferentes populações de leucócitos no sangue, foi feito um esfregaço de sangue que foi corado com corante de May Grunwald por 5 minutos, lavado com água por 2 minutos e contra corado com corante de Giemsa diluído dez vezes por 15 minutos. As lâminas foram secas e analisadas em microscópio de luz.

3.14 Soluções e drogas

3.14.1 Soluções

Azul de Toluidina

100 mg de Azul de Toluidina
500 ml de etanol
25 ml de formaldeído 30%
1 ml de ácido acético glacial
Água destilada q.s.p. 100 ml

Bjerrum ou tampão transferência

5,8 g de Tris
2,93 g de glicina
150 ml de metanol
Água MilliQ q.s.p. 1000 ml

Glicina ácida

15 g de glicina
1 g de SDS
10 ml de Tween 20
Água MilliQ q.s.p. 1000 ml (pH 2,2)

HBSS sem cálcio heparinizado

Hanks sem cálcio 490mg;
NaHCO₃ 1,75mg;
Heparina sódica 1000u;
50 ml água destilada q.s.p.

HBSS sem cálcio, com BSA

Hanks sem cálcio 490mg;
NaHCO₃ 1,75mg;
BSA 50mg;
50 mL água destilada q.s.p.

HBSS sem cálcio 10x concentrado

Hanks sem cálcio 4,9 g;
NaHCO₃ 17,5mg;
50 mL água destilada q.s.p.

HBSS com cálcio

Hanks com cálcio 490mg;
NaHCO₃ 1,75mg;
50 mL água destilada q.s.p.

OPT (abrigo de luz)

10 mg de OPT
10ml de metano

SDS 10%

50g de Dodecil sulfato de sódio (SDS)
Água MilliQ q.s.p. 500 ml

Solução de bloqueio

5 mg de BSA (albumina bovina fração V)
100 ml de TBST

Solução de lise

98 µl de tampão RIPA
1 µl de inibidor de protease halt phosphatase inhibitor cocktail 100x da Thermo
1 µl de inibidor de fosfatase halt protease inhibitor cocktail 100x da Thermo

TBS (10 vezes)

80 g NaCl

2 g KCl

30 g Tris base

Água MilliQ q.s.p. 1000 ml

Ajustar o pH 7,4

TBST

10 ml de TBS 10 vezes

500 µl de Tween 20

Água MilliQ q.s.p. 1000 ml

Tampão corrida (10 vezes)

30,3 Tris

144 g Glicina

Água MilliQ q.s.p. 1000 ml

Na hora que for usar:

100 ml de tampão corrida 10 vezes

10 ml de SDS 10%

Água MilliQ q.s.p. 1000 ml

Tampão amostra (5 vezes)

2,5 ml Tris-HCl 0,5 M

1g de SDS

50 mg de azul de bromofenol

0,5 ml de β-mercaptoetanol

5 ml de glicerol

Água MilliQ q.s.p. 10 ml

Tampão RIPA

625 mg de Tris

876,6 mg de NaCl

37,22 mg de EDTA
Água MilliQ q.s.p. 90 ml
Ajustar o pH para 7,4
1 g de Deoxicolato
100 mg de SDS
1 ml de triton X-100
Água MilliQ q.s.p. 100 ml

Tampão Tris-HCl 1,5 mM

181,6 g de Tris
10 ml de HCl fumegante
Água MilliQ q.s.p. 1000 ml
pH 8.8

Tampão Tris-HCL 500 mM

60 g de Tris
20 ml de HCl fumegante
Água MilliQ q.s.p. 1000 ml
pH 6,8

3.14.2 Drogas e reagentes

Dos reagentes utilizados, dexametasona, prednisolona, aminoguanidina, L-NAME, Hanks, NaHCO₃, BSA, DNP, Composto 48/80, HCl, NaOH foram obtidos da Sigma Aldrich (St. Louis, EUA). O Percoll foi obtido da GE Healthcare Bio-Sciences (Pittsburgh, EUA), a IgE anti DNP foi comprada da Santa Cruz Biotechnology (Califórnia, EUA), a histamina padrão foi obtida da Roche (São Paulo, Brasil). A Fita do glicosímetro é da Johnson & Johnson, o kit da frutossamina foi comprado do LABTEST Kit (Lagoa Santa, MG, Brasil). A Toluidina é da MERCK certistain. Os anticorpos anti-RAGE, anti-Galectina-3 e Anti-BAX são da Santa Cruz Biotechnology sob códigos sc-8230, sc-20157 e sc-493 respectivamente. Os anticorpos secundários são da LI-COR. A Acrilamida e o TEMED são da BIORAD. O SDS é da Sigma-Aldrich. O kit do TUNEL foi adquirido da ROCHE (*In Situ Cell Death Detection*

Kit, POD) catálogo n° 11 684 817 910. Inibidor de protease e fosfatase são da Thermo Science sob nome de “protease halt phosphatase inhibitor cocktail 100x” e “halt protease inhibitor cocktail 100x”, respectivamente

3.15 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) e analisados estatisticamente através de análise de variância (ANOVA), seguida de teste de comparação múltipla de Student Newman-Keuls. Para todos os testes, os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação do efeito do tratamento com AG sobre a redução do número e reatividade e aumento da taxa de apoptose de mastócitos induzidos por GC

No experimento que avalia o número de mastócitos contados da cavidade pleural, observamos a mastocitopenia nos ratos tratados com Dexa (Figura 5 A) e com Pred (Figura 5 B) comparado com o controle. Esse número é reestabelecido com o tratamento conjunto com AG (250 mg/kg, v.o.) O tratamento apenas com AG não é capaz de alterar o número de mastócitos contados.

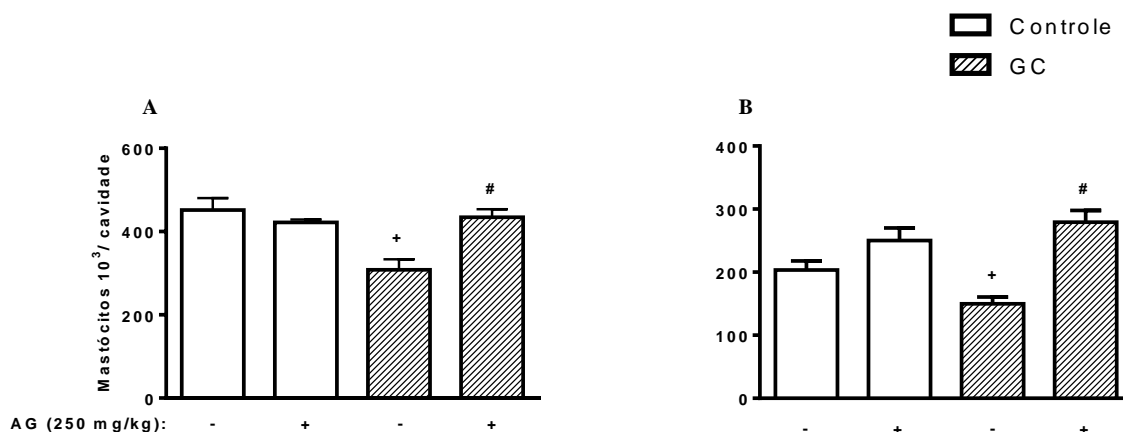


Figura 5: Efeito do tratamento com AG sobre a mastocitopenia pleural induzida por Dexa ou Pred. Os animais foram tratados uma vez ao dia, durante 21 dias com Dexa (A) ou Pred (B) (0,1 mg/kg, s.c.). O tratamento com AG (250 mg/kg, v.o.) foi realizado uma vez ao dia, iniciando-se no quarto dia de tratamento com o GC. Os dados foram expressos como média \pm EPM. As barras representam um grupo experimental de 5 animais. + $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. # $p < 0,05$ em relação ao grupo GC.

Como a AG também possui efeito de inibição de NO sintase, foi feito outro tratamento, porém usando a dose de inibição de NO sintase que não atua em AGEs. Foi utilizado também inibidor de NO sintase clássico, o L-NAME. Nesses tratamentos, a Dexa foi capaz de induzir redução de número de mastócitos, porém nem a AG nessa dose nem o L-NAME foram capazes de alterar o quadro de mastocitopenia induzido pela Dexa. Nem L-NAME nem AG em qualquer uma das doses individualmente foram capazes de alterar o número de mastócitos na cavidade pleural (Figura 6).

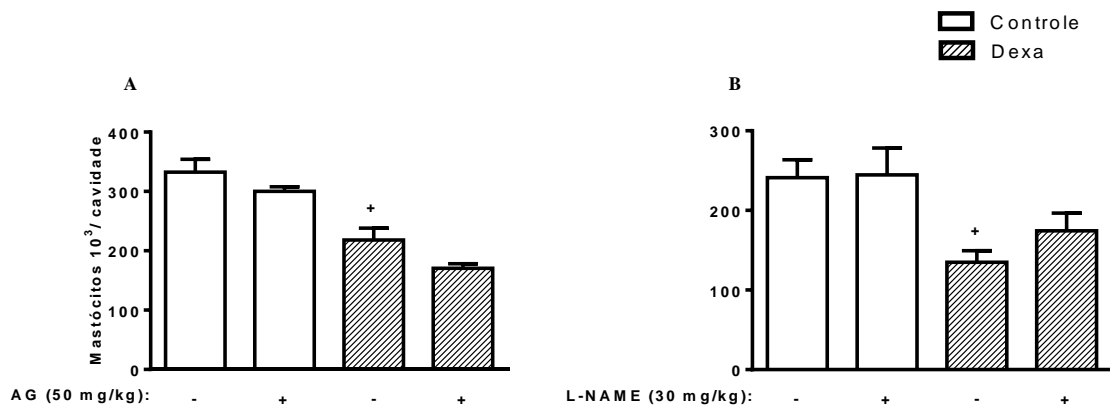


Figura 6: Efeito do tratamento com AG ou L-NAME sobre a mastocitopenia pleural induzida por Dexa. Os animais foram tratados uma vez ao dia, durante 21 dias com Dexa (0,1 mg/kg, s.c.). O tratamento com AG (50 mg/kg, v.o.) (A) ou L-NAME (30mg/kg, v.o.) (B) foi realizado uma vez ao dia, iniciando-se no quarto dia de tratamento com o GC. Os dados foram expressos como média \pm EPM. As barras representam um grupo experimental de 5 animais. + $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

Quando avaliada a reatividade dos mastócitos isolados de ratos (Figura 7), observamos um aumento da taxa de liberação de histamina dos mastócitos estimulados tanto com antígeno (Figura 7 A e C) quanto com o composto 48/80 (B e D). Além disso, comparando os grupos estimulados, observamos uma redução da reatividade das células provenientes de ratos tanto tratados com Dexametasona (Figura 7 A e B) quanto com Prednisona (Figura 7 C e D). Essa reatividade foi reestabelecida nos mastócitos tratados conjuntamente com AG. AG sozinha não foi capaz de interferir na estimulação de mastócitos.

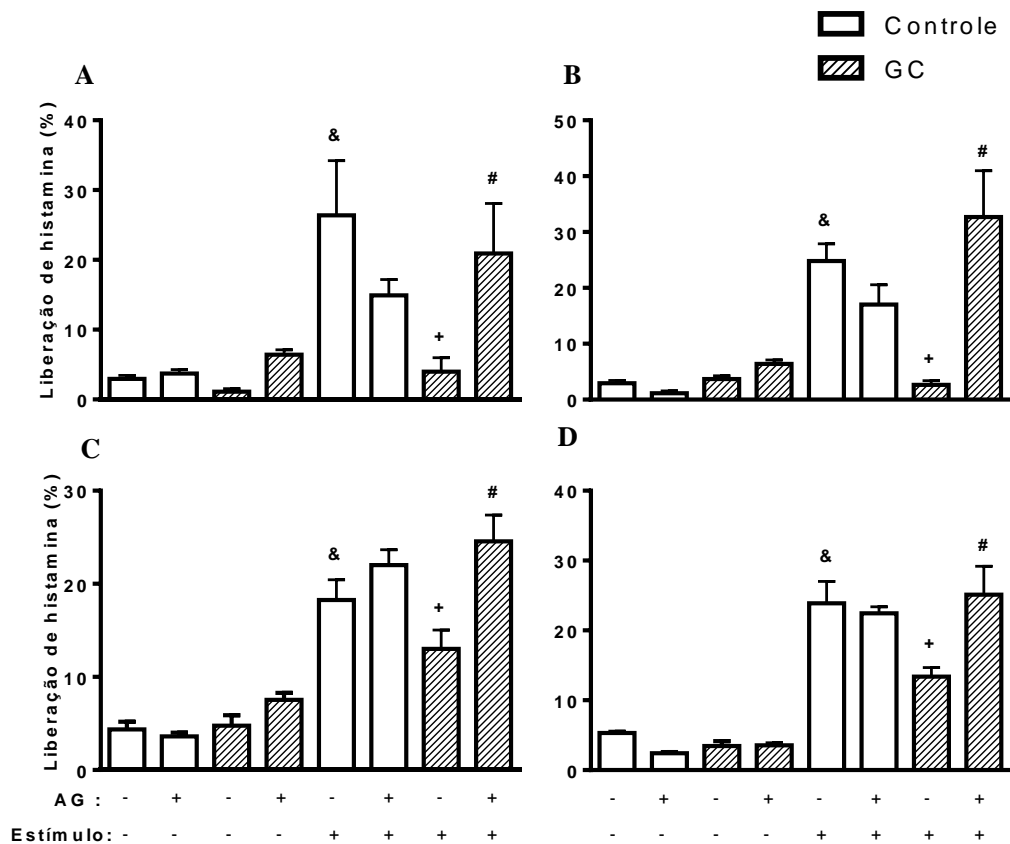


Figura 7: Efeito do tratamento com AG sobre a hipo-reatividade de mastócitos induzida por Dexametasona (A e B) ou Prednisona (C e D) frente à estimulação imunológica ou não-imunológica *in vitro*. Os animais foram tratados uma vez ao dia durante 21 dias com Dexametasona (A e B) ou Prednisona (C e D) (0,1 mg/kg, s.c.). O tratamento com AG (250 mg/kg, v.o.) foi realizado uma vez ao dia, iniciando-se no quarto dia de tratamento com os GCs. A e C forma estimulados com IgE anti DNP + DNP-BSA enquanto B e D foram estimulados com o composto 48/80. Os dados foram expressos como média \pm EPM. As barras representam um grupo experimental de 5 animais. & $p < 0,05$ em relação ao grupo controle não-estimulado. + $p < 0,05$ em relação ao grupo controle estimulado *in vitro*. # $p < 0,05$ em relação ao grupo tratado com GC e estimulado *in vitro*.

Com o intuito de avaliar se a redução do número de mastócitos induzido pelos GCs dava-se pela indução de apoptose e, o papel dos AGEs nesse processo, foi feito uma gota espessa de lavado peritoneal de ratos. Nesse ensaio pudemos observar um aumento na porcentagem de mastócitos positivos para TUNEL e a reversão desse efeito pelo tratamento com AG (Figura 8)

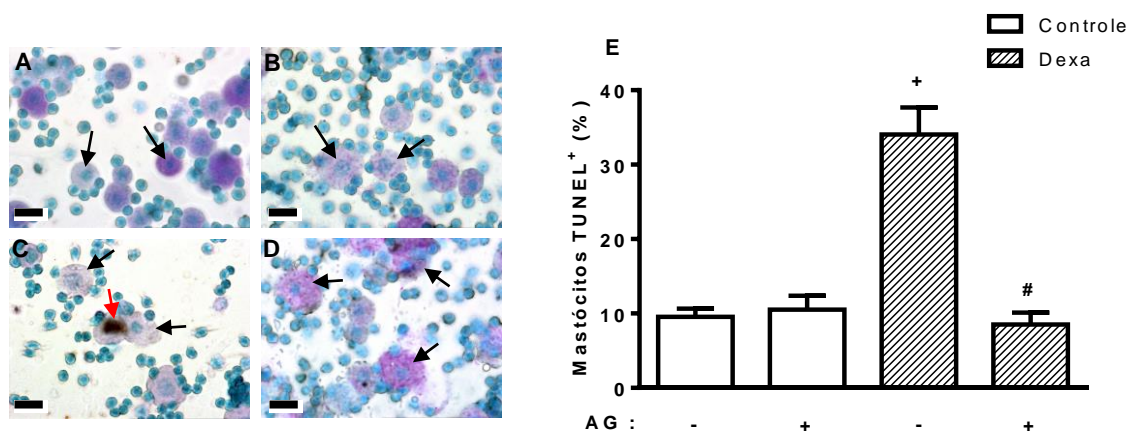


Figura 8: Avaliação da taxa de apoptose de mastócitos recolhidos de uma gota espessa de lavado peritoneal de ratos. Em A observa-se a imagem representativa de TUNEL do grupo controle. B representa o grupo tratado com AG, o grupo C representa o grupo tratado apenas com Dexa e D representa o grupo tratado com Dexa e AG conjuntamente. O tratamento consistiu em injeções de Dexa (0,1 mg/kg, sc.) por 21 dias e a partir do quarto dia de tratamento os animais foram tratados com AG (250mg/kg, v.o.). E expressa a quantificação de mastócitos toluidina e TUNEL positivos. As setas pretas indicam toluidina positiva e a seta vermelha indica TUNEL positivo. Os dados foram expressos como média \pm EPM. + $p < 0,05$ em relação ao grupo controle e * $p < 0,05$ em relação ao grupo Dexa.

4.2 Avaliação do efeito do tratamento com AG sobre os parâmetros metabólicos e imunossupressor induzidos por GC

Foi analisado o papel dos AGEs sobre os efeitos metabólicos observados no tratamento prolongado com GC (Figura 9). Foi observado a Dexa foi capaz de reduzir o peso dos animais após 21 dias de tratamento (Figura 9 A) induzir atrofia do músculo gastrocnêmico tanto macro (Figura 9 B) quanto microscopicamente (Figura 9 C e D). Contudo, o tratamento com AG não foi capaz de reverter essas alterações induzidas pela Dexa.

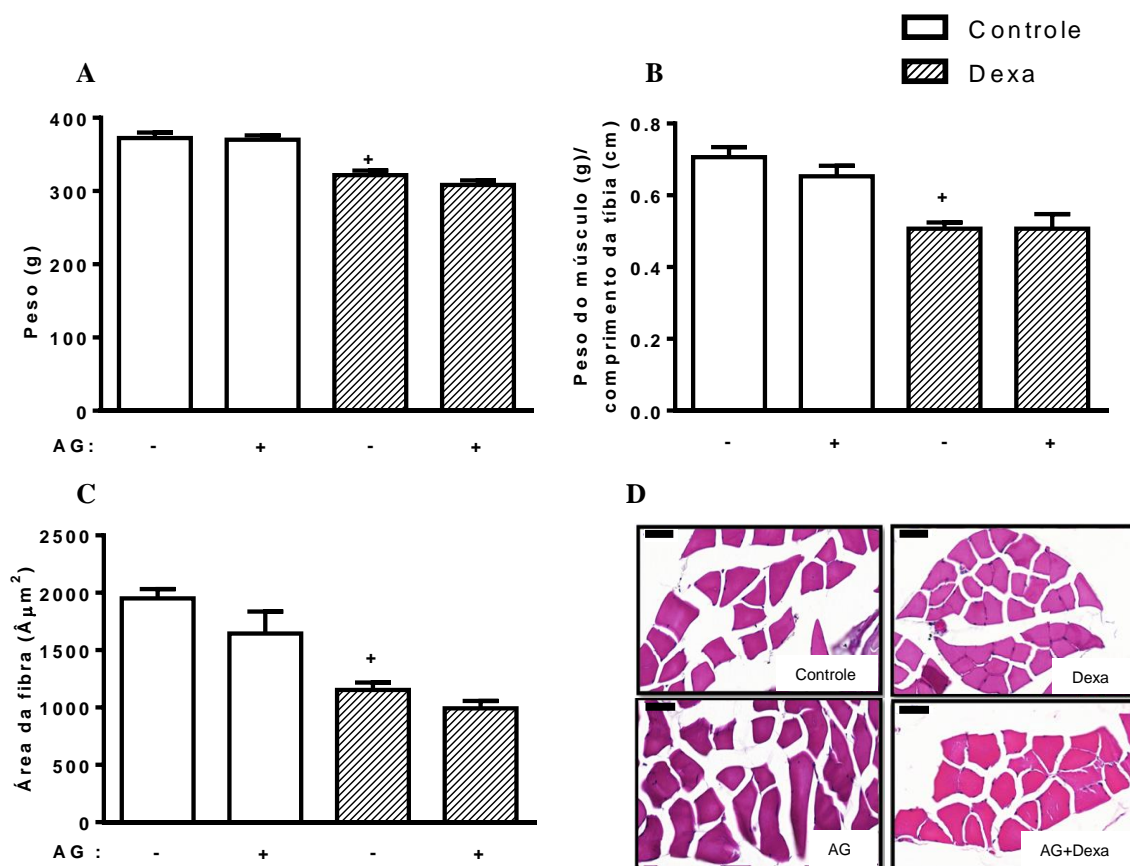


Figura 9: Papel do tratamento com AG sobre os efeitos metabólicos induzido por Dexa. Os animais foram tratados uma vez ao dia durante 21 dias com Dexa (0,1 mg/kg, s.c.). O tratamento com AG (250 mg/kg, v.o.) foi realizado uma vez ao dia, iniciando-se no quarto dia de tratamento com o GC. Em A foi mostrado o peso dos animais 24 horas após o último tratamento. B expressa a razão entre o

peso do músculo gastrocnêmio pela tibia. C expressa a quantificação da área das fibras musculares dos animais e em D é demonstrado as imagens representativas de C. Os dados foram expressos como média \pm EPM. + $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. A barra indicativa em cada imagem em D representa 50 μ m.

Foram então avaliados os efeitos dos AGEs sobre a população de leucócitos totais e sobre as populações de linfócitos, neutrófilos e monócitos a partir de um esfregaço de sangue (Figura 10). Observou-se que o tratamento com Dexa era capaz de reduzir a população de leucócitos totais (Figura 10 A), refletindo igualmente na população de linfócitos (Figura 10 B), contudo as populações de neutrófilos (Figura 10 C) e de monócitos (Figura 10 D) não sofreram alteração. Com o tratamento conjunto com a AG ambas as populações apresentaram alterações com o uma tendência a reestabelecer suas taxas basais, porém não atingiu significância estatística.

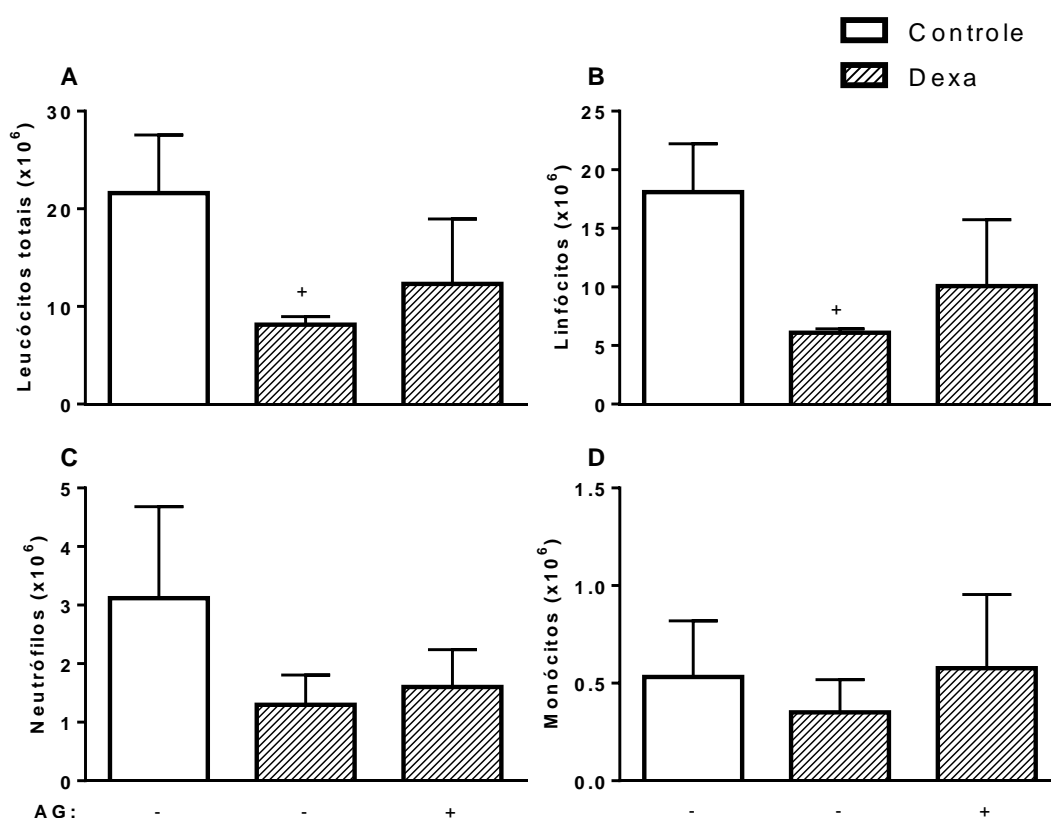


Figura 10: Efeito do tratamento com AG sobre a leucopenia induzida por Dexa. Os animais foram tratados uma vez ao dia, durante 21 dias com Dexa (0,1 mg/kg, s.c.). O tratamento com AG (250 mg/kg, v.o.) foi realizado uma vez ao dia, iniciando-se no quarto dia de tratamento com o GC. A representa o total de leucócitos obtidos a partir de punção da cauda dos animais. A partir de um esfregaço foi possível quantificar o número de linfócitos (B), neutrófilos (C) e monócitos (D). Os dados

foram expressos como média \pm EPM. As barras representam um grupo experimental de 5 animais. + $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

4.3 Avaliação do efeito do tratamento com GC sobre os níveis plasmáticos de frutosamina e glicose

Para avaliar o efeito dos GCs nos níveis dos AGEs, foi quantificado frutosamina a partir do plasma de ratos, como mostra a figura 11. Observamos que tanto a Dexametasona (Figura 11 A) quanto a Prednisona (Figura 11 B) não foram capazes de modificar significativamente os níveis de frutosamina (Figura 11 A e B). Além disso, o tratamento com a Dexametasona (Figura 11 C) e Prednisona (Figura 11 D) também não alteraram os níveis de glicemia nos animais.

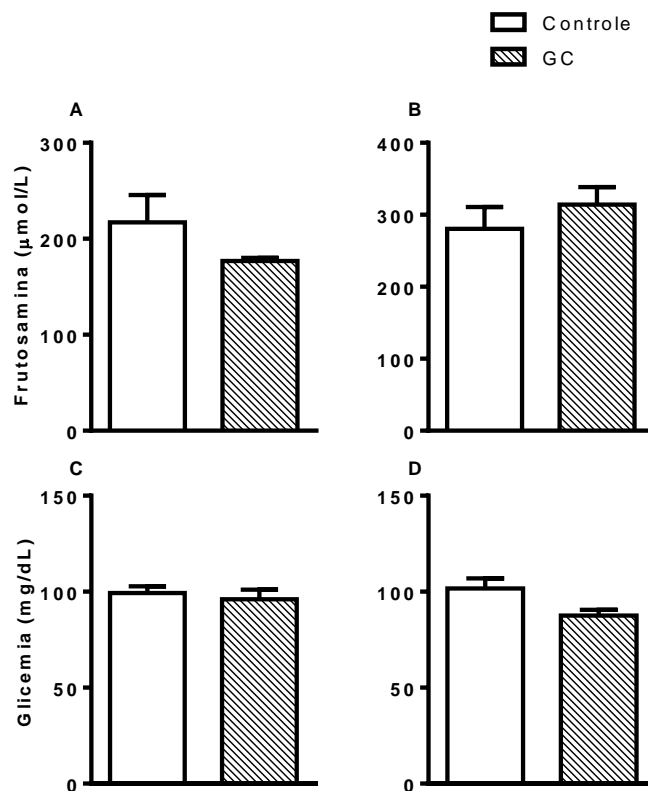


Figura 11: Efeito do tratamento com Dexa (A e C) ou Pred (B e D) sobre a frutosamina (A e B) e glicemia (C e D) de ratos Wistar. Os animais foram tratados uma vez ao dia durante 21 dias com

Dexa (A e C) ou Pred (B e D) (0,1 mg/kg, s.c.). Pode-se observar a quantificação de frutossamina em animais tratados com Dexa (A) e Pred (B) e os níveis de glicemia nos animais tratados com Dexa (C) e Pred (D). Os dados foram expressos como média \pm EPM. As barras representam um grupo experimental de 5 animais.

4.4 Avaliação do efeito do tratamento com GC sobre a expressão de receptores dos AGEs nos mastócitos e na musculatura esquelética

A expressão de receptores de AGEs, RAGE e Galectina-3, foi quantificada através da técnica Western blot com ou sem tratamento com GC (Figura 12). Observou-se que os animais tratados com Dexa expressaram mais RAGE (A e B) e Galectina-3 (A e C) nos mastócitos, o que não foi observado nos mastócitos provenientes de animais tratados conjuntamente com AG. O tratamento apenas com AG não alterou a expressão desses receptores (Figura 12).

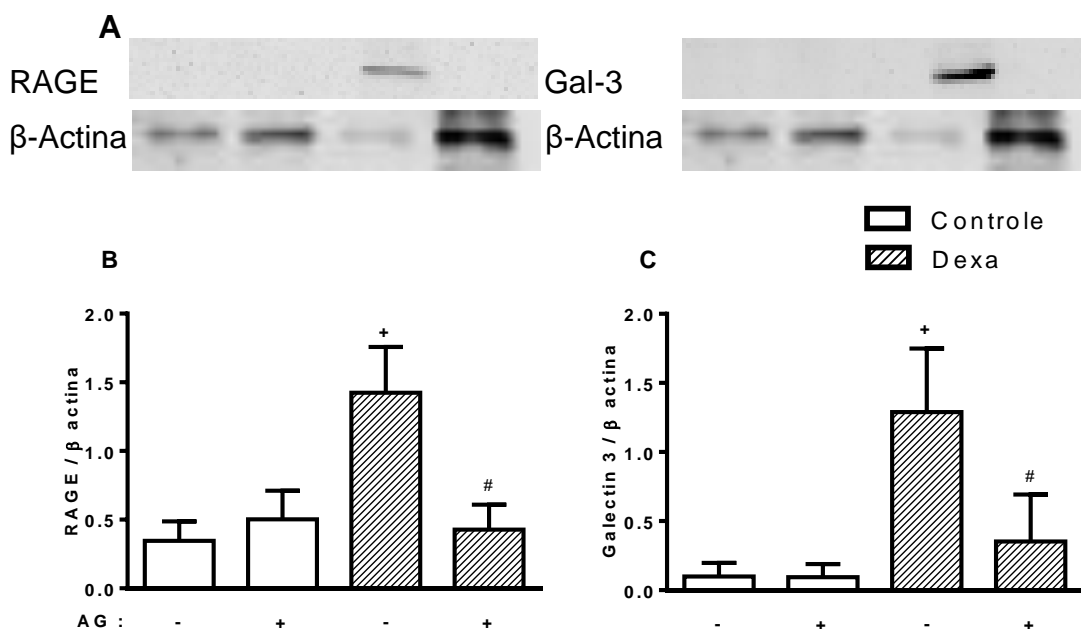


Figura 12: Efeito do tratamento com AG sobre a o aumento de expressão de RAGE (A e B) e Galectina-3 (A e C) induzido por Dexa em mastócitos. Os animais foram tratados uma vez ao dia durante 21 dias com Dexa (0,1 mg/kg, s.c.). O tratamento com AG (250 mg/kg, v.o.) foi realizado uma vez ao dia, iniciando-se no quarto dia de tratamento com o GC Cada banda representa pool de 3

animais e o resultado apresentado é um representativo de dois experimentos distintos com 3 pools cada. Os dados foram expressos como média \pm EPM. + $p < 0,05$ em relação ao grupo controle e # $p < 0,05$ em relação ao grupo Dexa.

No mesmo sentido fomos avaliar se o tratamento com Dexa era capaz de alterar a expressão de receptores dos AGEs na musculatura esquelética (Figura 13). Foi observado que não houve alteração na expressão dos receptores frente ao tratamento com GC (figura 13).

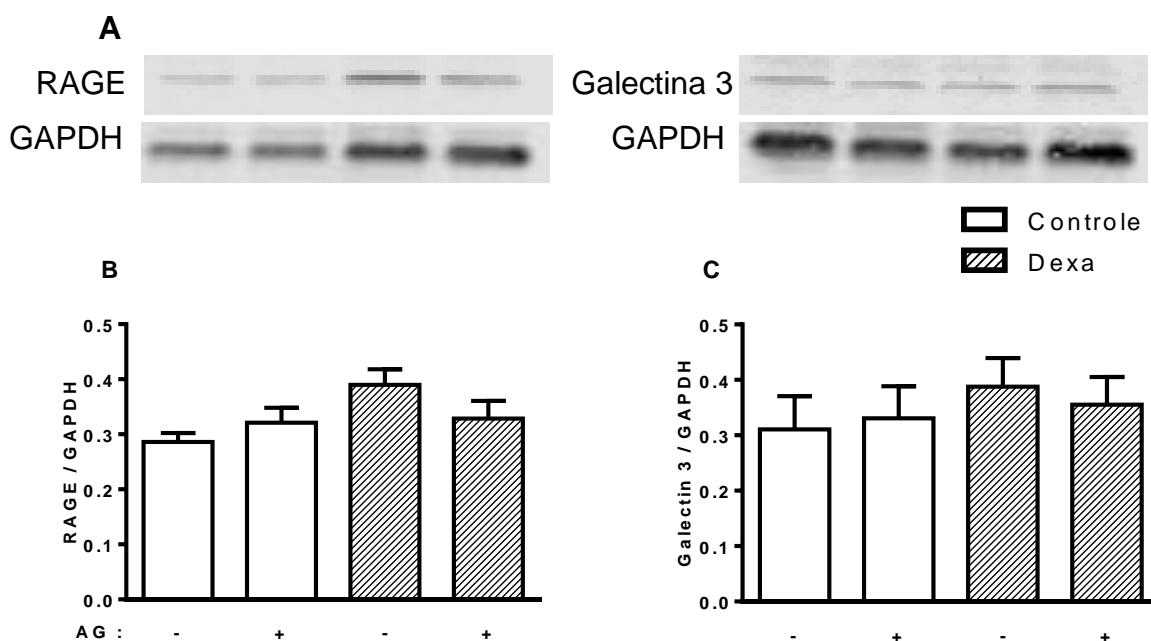


Figura 13: Efeito do tratamento com Dexa sobre a expressão de RAGE (A e B) e Galectina-3 (A e C) no músculo gastrocnêmio. Os animais foram tratados uma vez ao dia durante 21 dias com Dexa (0,1 mg/kg, s.c.) e com AG (250 mg/kg, v.o.) a partir do quarto dia de tratamento com a Dexa. As bandas (A) são representativas de dois experimentos distintos da expressão de RAGE (A e B) ou Galectina-3 (A e C).. Os dados foram expressos como média \pm EPM.

4.5 Avaliação do efeito do tratamento com inibidores de receptores do AGEs sobre a redução de número de mastócitos da cavidade peritoneal e mesentério

Com o intuito de avaliar se o efeito do GC está relacionado com os receptores dos AGEs, foi feita a avaliação do número de mastócitos na cavidade peritoneal de camundongos machos Swiss tratados com Dexa conjuntamente com inibidores seletivos de Galectina-3 (GSC-100) ou RAGE (FPS-ZM1). Foi possível observar a já a redução do número de mastócitos provenientes da cavidade peritoneal de animais tratados com Dexa e que o tratamento com FPS-ZM1 ou GSC-100 foi capaz de reestabelecer o número de mastócitos (Figura 14). Esses mesmos resultados foram observados nos mastócitos contados do mesentério dos mesmos camundongos (Figura 15).

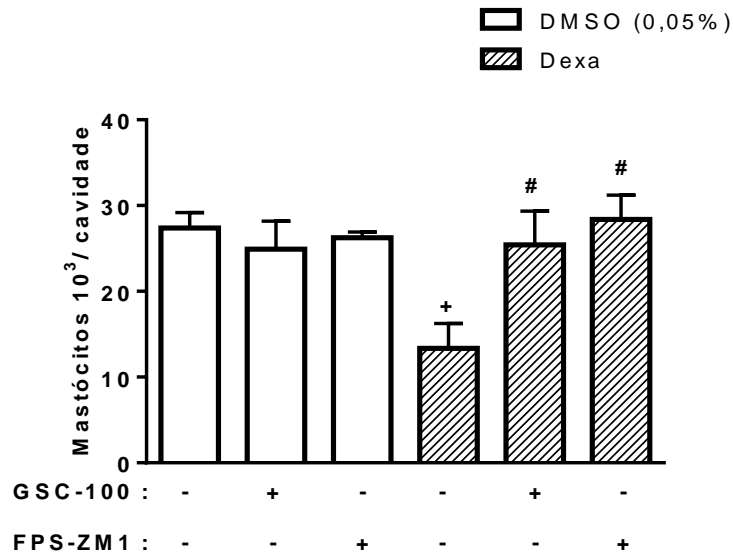


Figura 14: Efeito do tratamento com GSC-100 ou FPS-ZM1 sobre a mastocitopenia peritoneal induzida por Dexa. Os camundongos foram tratados uma vez ao dia, durante 21 dias com Dexa (0,1 mg/kg, s.c.). Os tratamentos com GSC-100 (1mg/kg, v.o) ou FPS-ZM1 (1mg/kg em DMSO 0,05%, i.p.) foram realizados uma vez ao dia, iniciando-se no quarto dia de tratamento com o GC. Os dados foram expressos como média \pm EPM. As barras representam um grupo experimental de 5 animais. + $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. # $p < 0,05$ em relação ao grupo GC.

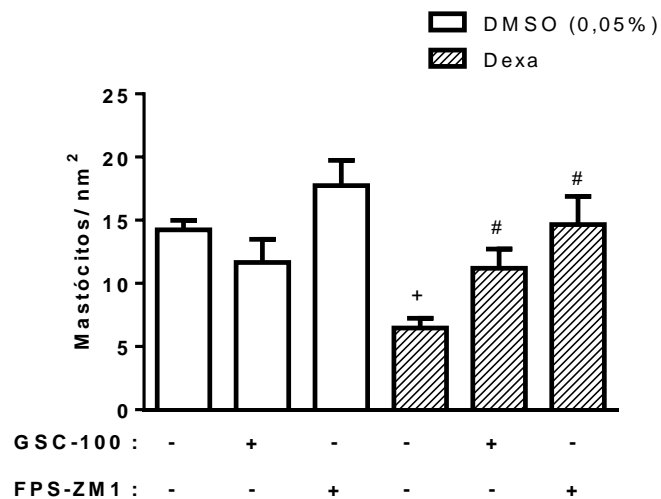


Figura 15: Efeito do tratamento com GSC-100 ou FPS-ZM1 sobre a redução de mastócitos em mesentério de camundongo induzida por Dexa. Os animais foram tratados uma vez ao dia, durante 21 dias com Dexa (0,1 mg/kg, s.c.). Os tratamentos com GSC-100 (1mg/kg, v.o) ou FPS-ZM1

(1mg/kg em DMSO 0,05%, i.p.) foram realizados uma vez ao dia, iniciando-se no quarto dia de tratamento com o GC. Os dados foram expressos como média \pm EPM. As barras representam um grupo experimental de 5 animais. + $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. # $p < 0,05$ em relação ao grupo GC.

Com o objetivo de avaliar o efeito da inibição de receptores dos AGEs sob os efeitos imunossupressores dos GCs, foi feito um esfregaço de sangue e foram avaliadas as populações de leucócitos totais e as subpopulações de linfócitos, neutrófilos e monócitos (Figura 16). Foi possível observar a redução do número absoluto de leucócitos (Figura 16 A) e de linfócitos (Figura 16 B), porém não foi visto uma redução na população de neutrófilos. Não foram observados monócitos em nenhum dos esfregaços. Nesse estudo nem o inibidor de Galectina-3 (GSC-100) nem o inibidor de RAGE (FPS-ZM1) foram capazes de reverter a redução de número absoluto dessas células.

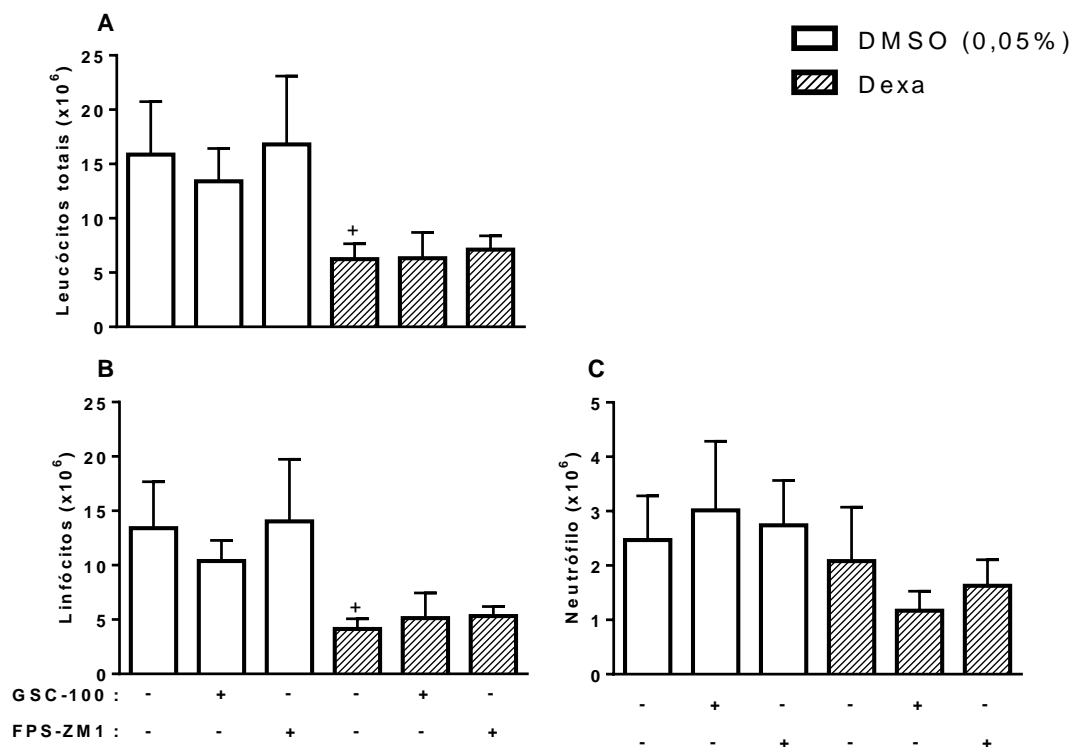


Figura 16: Efeito da inibição de receptores dos AGEs sobre a leucopenia induzida por Dexa. Os camundongos foram tratados uma vez ao dia, durante 21 dias com Dexa (0,1 mg/kg, s.c.). O tratamento com GSC-100 (1 mg/kg, v.o.) ou com FPS-ZM1 (1 mg/kg em DMSO 0,05%, i.p) foi iniciando no quarto dia de tratamento com o GC. Os dados foram expressos como média \pm EPM. As barras representam um grupo experimental de 5 animais. + $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

Os camundongos foram então avaliados quanto ao peso final em que chegaram após o tratamento com a Dexa por 21 dias (Figura 17). Foi observado uma redução do peso dos animais tratados com o GC quando comparados aos animais controle, contudo, os animais tratados com os inibidores de receptores dos AGEs GSC-100 e FPS-ZM1 não foram capazes de reverter esse efeito.

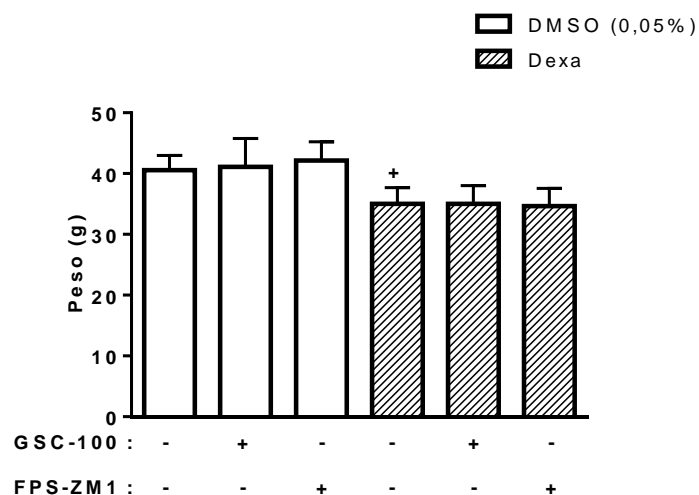


Figura 17: Papel do tratamento com inibidores de receptores dos AGEs sobre a redução de peso induzido por Dexa. Os camundongos foram tratados uma vez ao dia durante 21 dias com Dexa (0,1 mg/kg, s.c.). A partir do quarto dia de tratamento, alguns animais foram tratados com inibidor de galectina-3, GSC-100 (1 mg/kg, v.o.) ou com inibidor de RAGE, FPS-ZM1 (1 mg/kg em DMSO 0,05%, i.p). Os dados foram expressos como média \pm EPM. + $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

5 DISCUSSÃO

Em nosso estudo, o tratamento com GCs por 21 dias proporcionou uma já redução do número de mastócitos, conforme já descrito anteriormente (GABOURY JP, NIU XF e KUBES P, 2010). O tratamento dos animais com inibidor de AGE, a AG (250 mg/kg), concomitantemente tanto com Dexametasona quanto com Prednisona foi capaz de restaurar o número de mastócitos a valores observados em animais controles. Uma possível explicação para esse resultado seria a ação hiperglicêmica do GC (BEAUDRY JL et al, 2013), o que causaria um aumento na formação dos AGEs, e com isso, haveria um aumento na taxa de apoptose dos mastócitos, pois foi descrito que os AGEs são capazes de induzir esse tipo de morte celular (MIN C *et al* 1999). O tratamento com AG em animais não tratados com GC não alterou o número de mastócitos pleurais comparado ao grupo controle, o que descartaria a possibilidade de a AG estar aumentando de alguma forma a sobrevivência de mastócitos.

A AG além de inibir a formação dos AGEs também é capaz de inibir a atividade da NO sintase. Com o intuito de avaliar se o efeito da AG sobre a redução no número de mastócitos induzida por GCs é dependente da inibição de NO sintase, foi realizado o tratamento dos animais com AG na dose de 50 mg/kg, que é uma dose capaz de inibir a atividade de NO sintase, mas não é capaz de fazer “scavenger” dos AGEs. Foi utilizado também o composto L-NAME, um clássico inibidor não seletivo de NO sintase, na dose de 30 mg/kg em um grupo paralelo de ratos. Os resultados mostraram que os tratamentos com os inibidores de NO sintase não foram capazes de reestabelecer a população de mastócitos. Esse resultado nos leva a considerar que o efeito de inibição dos AGEs é essencial para a atividade protetora da AG sobre a mastocitopenia observada em animais tratados com GC, motivo pelo qual doravante foi usada a AG apenas na dose de 250 mg/kg. Fenômeno semelhante foi observado em nosso grupo anteriormente, no qual animais diabéticos apresentam uma redução de número de mastócitos pleurais dependente do aumento dos níveis circulantes de GCs (DIAZ BL *et al* 1996). E que esta mastocitopenia também era revertida pela aminoguanidina em doses capazes de inibir a geração dos AGEs, sem, no entanto, ser restaurada quando os animais foram tratados com L-NAME (CARVALHO *et al* 2009).

Com o intuito de analisar se a redução da reatividade de mastócitos induzidos pelo tratamento com GC estava relacionada com os AGES, foram isolados mastócitos a partir de um lavado da cavidade peritoneal e avaliadas suas capacidades de degranular frente à estímulos. Essas células se mostraram mais responsivas, ou seja, liberaram mais histamina quando estimuladas tanto por via imunológica, através de reação antígeno-anticorpo (IgE anti-DNP + DNP/BSA) quanto por via não-imunológica (composto 48/80) *in vitro* quando comparadas com as células incubadas com meio. Esses dados estão em consonância com resultados prévios da literatura que mostram que a ativação cruzada de receptores de alta afinidade para IgE culmina em uma imediata liberação da histamina presente nos grânulos dos mastócitos (MIRZAHOSSEINI A, DALMADI B e CSUTORA P, 2013). Além disso, é conhecido que o composto 48/80 é um agente degranulador de mastócitos clássico no qual não há participação de resposta imune (SCHEMANN M *et al*, 2012).

Mastócitos isolados de animais tratados com Dexa ou Pred mostraram-se hiporreativos, ou seja, liberaram menos histamina frente à estimulação imunológica ou não-imunológica *in vitro* em comparação com mastócitos provenientes de animais controle. Esse fenômeno de indução de hiporeatividade mastocitária induzida pelos GCs, além da capacidade de reduzir o número de mastócitos, pode ser explicado pelo fato de os GCs serem capazes de induzir apoptose de mastócitos (KOWLURU RA, 2005) o que inicialmente poderia torná-los hiporreativos por estarem pouco funcionais. O tratamento dos animais apenas com AG não foi capaz de alterar a reatividade dos mastócitos. Mastócitos provenientes de animais tratados com Dexa ou Pred conjuntamente com AG apresentaram sua reatividade restaurada frente à estimulação imunológica e não-imunológica *in vitro*, em comparação com mastócitos provenientes de animais tratados apenas com Dexa ou Pred estimulados nas mesmas condições. Esses dados sugerem que a mastocitopenia induzida pelo tratamento com GCs parece envolver, de alguma forma, os AGEs. Nesse caso foram utilizados tanto Dexa quanto Pred como GC para verificar se os efeitos observados eram exclusivos da Dexa, porém, como as respostas foram semelhantes, essa hipótese foi descartada. Com isso, doravante foi utilizado apenas a Dexa como GC de referência.

Com o objetivo de avaliar se a redução do número de mastócitos induzido pelo tratamento com GC estava ocorrendo por apoptose das células, foi feito um ensaio com TUNEL em uma gota espessa de lavado peritoneal. Os mastócitos se encontravam em maior porcentagem positivos para túnel no grupo tratado apenas com o GC, o que já foi descrito pela literatura (KOWLURU RA, 2005). Em paralelo, o tratamento conjunto com AG foi capaz de reestabelecer a taxa de apoptose a níveis basais. Esses dados estão em consonância com dados já apresentados no nosso laboratório que mostrou que os AGEs eram capazes de induzir apoptose em mastócitos de animais diabéticos (CARVALHO VF *et al* 2011)

Uma vez que a AG se mostrou muito eficaz em reverter os efeitos dos GC em mastócitos, foi feita uma avaliação do papel dos AGEs frente aos efeitos metabólicos da Dexa. Após os 21 dias de tratamento com essa droga, os animais foram pesados e foi observado a já esperada redução da média de peso dos animais tratados apenas com o GC (BERTHON BS, MACDONALD-WICKS LK e WOOD LG, 2014). Contudo o tratamento com a AG nos 18 últimos dias de tratamento com a Dexa não foi capaz de reverter a redução do peso dos animais. Então foi feita a análise do efeito dos AGEs sobre a atrofia muscular induzida por GC. Foi observada uma redução dessa razão, o que confirma a atrofia muscular característica do tratamento com os GCs (SCHAKMAN O *et al* 2013). A partir desse resultado foi feita uma análise microscópica da área da fibra muscular, e foi visto que o tratamento com a Dexa induziu uma redução nesse parâmetro, confirmando a observação macroscópica da indução da atrofia muscular induzida por GC. Nenhum desses quesitos analisados foram alterados com o tratamento conjunto com AG. Assim, pela primeira vez, é confirmada uma dissociação do mecanismo anti-inflamatório induzido por GCs do seu efeito metabólico.

Foi então realizado uma análise do efeito dos AGEs sobre a redução do número de linfócitos induzido por GC. Observou-se que houve uma redução significativa da população de leucócitos no sangue dos animais tratados com GC. Essa redução provavelmente está relacionada com a redução de linfócitos, característico do uso de GCs (LIDDICOAT DR *et al* 2014). Nesses casos, o tratamento conjunto com AG não reestabeleceu a população dessas células. Não há diferença significativa nas populações de neutrófilos e monócitos frente ao tratamento com Dexa.

Apesar de GCs apresentarem efeito hiperglicemiante (LIU XX *et al* 2014), animais tratados com Dexa e Pred não apresentaram aumento de glicemia em jejum. Em paralelo não houve maior detecção de frutossamina (albumina glicada) nos animais tratados com essas drogas quando comparados com o controle. Contudo, não se pode descartar que a mastocitopenia induzida por GCs não está relacionada com o eixo AGEs-RAGEs, uma vez que a ativação dos receptores dos AGEs em mastócitos induz a apoptose dos mesmos (LI DX *et al* 2014). Além disso, GCs podem induzir o aumento da expressão tanto de RAGE (DJERBI N *et al* 2013) como de Gal-3 (MALDONADO CA *et al* 2011) queratinócitos humanos e célula clara de pulmão, respectivamente. Observamos um aumento de expressão de RAGE e galectina-3 em mastócitos provenientes de ratos tratados com Dexa. O tratamento com AG foi capaz de reverter esse aumento. O que permite concluir que a AG está bloqueando o aumento da expressão de receptores dos AGEs induzidos por GC. Esses dados vão de encontro a literatura que mostra que o tratamento com AG também é capaz de inibir o aumento de expressão dos receptores dos AGEs em alguns tecidos de animais diabéticos (CHANG PC *et al* 2014).

Não foram observadas alterações tanto na expressão de RAGE quanto na de Gal-3 no músculo esquelético de animais tratados com Dexa e o tratamento com AG não interferiu na expressão dessas moléculas, sugerindo que os receptores dos AGEs não estão envolvidos na atrofia muscular induzida por GC.

Para comprovar a participação dos receptores dos AGEs na mastocitopenia, animais tratados com GC foram concomitantemente tratados com inibidores específicos desses receptores (inibidor de Gal-3: GSC-100 e inibidor de RAGE: FPS-ZM1). Foi observado a redução do número de mastócitos induzido pelo tratamento com GC e cada um dos inibidores específicos de receptores dos AGEs foi capaz de reverter a mastocitopenia a níveis observados em animais controle. Os inibidores sozinhos não foram capazes de alterar a população de mastócitos. Dessa forma pode-se concluir que o efeito redutor de número de mastócitos induzidos por GC está de fato relacionado com o aumento da expressão de receptores dos AGEs e da sua ativação. Esse fenômeno foi observado tanto em mastócitos contados do lavado peritoneal quanto do mesentério. Esses dados confirmam resultados da literatura, uma vez que a galectina-3 pode induzir morte de mastócitos por estresse oxidativo (SUZUKI Y *et al* 2008). No presente experimento foi feita a contagem de mastócitos

do mesentério, porque já se sabe que Gal-3 é capaz de internalizar receptores FCεRI complexados a IgE, o que inibe desgranulação de mastócitos, além disso, Gal-3 promove maior adesão de mastócitos, o que poderia causar uma redução do número de mastócitos contados a partir do espaço peritoneal (BAMBOUSKOVA M *et al*, 2016).

Fomos então avaliar o efeito dos inibidores de receptores dos AGEs na redução de leucócitos. Apesar de observarmos a redução do número total de leucócitos e do número de linfócitos induzidos pelo GC, nenhum dos inibidores de receptores dos AGEs foi capaz de reverter essa redução. Esse dado indicaria que a redução dessas populações induzidas por GC não estaria relacionada com o aumento da expressão de RAGE ou Gal-3. A população de neutrófilos mais uma vez não foi alterada com o tratamento de nenhuma das drogas. Por fim foram avaliados os efeitos dos inibidores de receptores dos AGEs frente aos efeitos metabólicos. Foram então analisadas as médias do peso final dos animais ao final do tratamento. Os animais tratados com Dexa apresentavam um peso corporal significativamente menor do que dos animais controle (figura 17). A inibição dos receptores dos AGEs não foi capaz de normalizar o peso dos animais. Esse dado corrobora com o do tratamento concomitante com AG, que permitia concluir que os efeitos dos GCs na musculatura esquelética não estariam sendo influenciadas pelos receptores dos AGEs. Assim, pode-se confirmar que há uma dissonância da via de atuação dos GC nos efeitos metabólicos dos efeitos antialérgicos, sendo esse último dependente dos AGEs e seus receptores.

6 CONCLUSÕES

Esse trabalho nos permitiu concluir que o tratamento prolongado com GC aumenta a expressão de receptores dos AGEs em mastócitos. A ativação do eixo RAGEs/AGEs induzido por GC está relacionado com seu efeito pró-apoptótico nos mastócitos. Essa via, porém, é independente do mecanismo de indução de atrofia muscular, redução de peso corporal e linfopenia circulante, efeitos secundários do uso dos glicocorticoides nesse estudo.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andrade MV, Iwaki S, Ropert C, Gazzinelli RT, Cunha-Melo JR e Beaven MA. Amplification of cytokine production through synergistic activation of NFAT and AP-1 following stimulation of mast cells with antigen and IL-33. *Eur J Immunol.* 2011. v.41 p.760–772.

Ansari N e Dash D. Amadori Glycated Proteins: Role in Production of Autoantibodies in Diabetes Mellitus and Effect of Inhibitors on Non-Enzymatic Glycation. *Aging Dis.* 2013 Feb; 4(1): 50–56

Bambouskova M, Polakovicova I, Halova I, Goel G, Draberova L, Bugajev V, Doan A, Utekal P, Gardet A, Xavier RJ e Draber P. New Regulatory Roles of Galectin-3 in the High-affinity IgE Receptor Signaling. *Mol Cell Biol.* 2016 Feb 29.

Barbosa J, Oliveira S e Tojal-Seara L. O Papel dos Produtos Finais da Glicação Avançada (AGEs) no Desencadeamento das Complicações Vasculares do Diabetes. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2008; 52/6:940-950

Basu S, Fenton MJ. Toll-like receptors: function and roles in lung disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* (2004) 286(5):L887–92.

Beato M e Klug J. Steroid hormone receptors: an update. *Hum Reprod Update* 2000 (6):225–236..

Beaudry JL, D'Souza AM, Teich T, Tsushima R e Riddell MC. Exogenous glucocorticoids and a high-fat diet cause severe hyperglycemia and hyperinsulinemia and limit islet glucose responsiveness in young male Sprague-Dawley rats. *Endocrinology.* 2013.v.154 p.3197-208.

Berthon BS, MacDonald-Wicks LK e Wood LG. A systematic review of the effect of oral glucocorticoids on energy intake, appetite, and body weight in humans. *Nutr Res.* 2014 Mar;34(3):179-90.

Bradding P. Allergen immunotherapy and mast cells. *Clin Exp Allergy* (1999) 29(11):1445–8.

Bulfone-Paus S, Bahri R. Mast cells as regulators of T cell responses. *Front Immunol* (2015)6:394.

Carvalho VF, Barreto EO, Farias-Filho FO, Gomes LHF, Mendonça LL, Cordeiro RSB, Martins MA e Silva PRM. Reduced expression of IL-3 mediates intestinal mast cell depletion in diabetic rats: role of insulin and glucocorticoid hormones *Int. J. Exp. Path.* 2009. v. 90 p.148–155.

Carvalho VF, Florim LT, Barreto EO, Torres RC, Batista MM, Amendoeira FC, Cordeiro RSB, Martins MA e Silva PMR Inhibition of advanced glycation end products by aminoguanidine restores mast cell numbers and reactivity in alloxan-diabetic rats. *Eur J Pharmacol.* 2011 Nov 1;669(1-3):143-8.

Chang PC, Chong LY, Tsai SC, Lim LP. Aminoguanidine inhibits the AGE-RAGE axis to modulate the induction of periodontitis but has limited effects on the progression and recovery of experimental periodontitis: a preliminary study. *J Periodontol.* 2014 May;85(5):729-39.

Collington SJ, Williams TJ, Weller CL. Mechanisms underlying the localisation of mast cells in tissues. *Trends Immunol* (2011) 32(10):478–85.

Conti P e Kempuraj D. Important role of mast cells in multiple sclerosis. *Multiple sclerosis and related disorders.* 2016 jan 5:77–80

da Silva EZ, Jamur MC, Oliver C. Mast cell function: a new vision of an old cell. *J Histochem Cytochem* (2014) 62(10):698–738

Dahlman WK, Wright A, Gustafsson JA, et al. Interaction of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain with DNA as a dimer is mediated by a short segment of five amino acids. *J Biol Chem* 1991;266:3107–12.

Dawicki W, Marshall JS. New and emerging roles for mast cells in host defence. *Curr Opin Immunol.* 2007.v.19 p.31–38.

Deane R, Singh I, Sagare AP, Bell RD, Ross NT, LaRue B, Love R, Perry S, Paquette N, Deane RJ, Thiyagarajan M, Zarcone T, Fritz G, Friedman AE, Miller BL, Zlokovic BV. A multimodal RAGE-specific inhibitor reduces amyloid β -mediated brain disorder in a mouse model of Alzheimer disease. *J Clin Invest.* 2012 Apr;122(4):1377-92.

Diaz BL, Serra MF, Alves AC, Pires ALA, Corrêa FMA, Cordeiro RSB, Martins MA, E Silva PMR. Alloxan diabetes reduces pleural mast cell numbers and the subsequent eosinophil influx induced by allergen in sensitized rats. *Int Arch Allergy Immunol:* 1996.v. 111 p. 36-43.

Djerbi N, Dziunycz PJ, Reinhardt D, Iotzova-Weiss G, Hafner J, Läubli S, French LE, Hofbauer GF. Influence of cyclosporin and prednisolone on RAGE, S100A8/A9, and NF κ B expression in human keratinocytes. *JAMA Dermatol.* 2013 Feb;149(2):236-7.

Dušková M, Sosvorová L, Vítků J, Jandíková H, Rácz B, Chlupáčová T, De Cordeiro J, Stárka L. Changes in the Concentrations of Corticoid Metabolites--The Effect of Stress, Diet and Analytical Method. *Prague Med Rep.* 2015;116(4):268-78.

Ehrlich P. Beiträge zur Kenntnis der Anilinfärbungen und ihrer Verwendung in der mikroskopischen Technik. *Arch. mikr. Anat.* 1877;13:263–277

Ferry X., Brehin S., Kamel R., Landry Y. 2002. G protein-dependent activation of mast cell by peptides and basic secretagogues. *Peptides* 23: 1507–1515

Finotto S, Mekori AY e Metcalfe DD. Glucocorticoids Decrease Tissue Mast Cell Number by Reducing the Production of the c-kit Ligand, Stem Cell Factor, by Resident Cells *The Journal of Clinical Investigation*.2005. v.10 p.301-11.

Forbes JM, Soulis T, Thallas V, Panagiotopoulos S, Long DM, Vasan S, Wagle D, Jerums G, Cooper ME. Renoprotective effects of a novel inhibitor of advanced glycation. *Diabetologia*. 2001; 44: 108–114.

Galli SJ, Tsai M. Mast cells in allergy and infection: versatile effector and regulatory cells in innate and adaptive immunity. *Eur J Immunol* 2010 v.40 p.1843–1851. .

Gilfillan AM, Beaven MA. Regulation of mast cell responses in health and disease. *Crit Rev Immunol*. 2011 v.31 p.475-529.

Greenblatt RB. *Search the Scriptures*. J.P. Lippincott 1997 45-48

Gu Y, Yang DK, Spinass E, Kritas SK, Saggini A, Caraffa A, Antinolfi P, Saggini R, Conti P. Role of TNF in mast cell neuroinflammation and pain. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2015 Oct-Dec;29(4):787-91.

Hench PS. The reversibility of certain rheumatic and non-rheumatic conditions by the use of cortisone or of the pituitary adrenocorticotrophic hormone. World Scientific Publishing Company 1999: 311–41

Hitomi T, Zhang J, Nicoletti LM, Grodzki AC, Jamur MC, Oliver C, Siraganian RP. Phospholipase D1 regulates high-affinity IgE receptor-induced mast cell degranulation. *Blood*. 2004 Dec 15; 104(13):4122-8.

Hodges K, Kennedy L, Meng F, Alpini G, Francis H. Mast cells, disease and gastrointestinal cancer: A comprehensive review of recent findings. *Transl Gastrointest Cancer*. 2012 Jul 1;1(2):138-150

Irvin C1, Zafar I, Good J, Rollins D, Christianson C, Gorska MM, Martin RJ, Alam R. Increased frequency of dual-positive TH2/TH17 cells in bronchoalveolar lavage fluid characterizes a population of patients with severe asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2014 nov;134(5):1175-1186

Ishizaka K e Campbell DH. Biologic activity of soluble antigen-antibody complexes. IV. The inhibition of the skin reactivity of soluble complexes and the PCA reaction by heterologous complexes. *J Immunol*. 1959 Aug; 83():116-26.

Ishizaka K, Ishizaka T Identification of gamma-E-antibodies as a carrier of reaginic activity. *J Immunol*. 1967 Dec; 99(6):1187-98.

Jamur MC, Grodzki AC, Berenstein EH, Hamawy MM, Siraganian RP, Oliver C. Identification and characterization of undifferentiated mast cells in mouse bone marrow. *Blood* (2005) 105(11):4282–9

Jensen LJM, Flyvbjerg A e Bjerre M. Soluble Receptor for Advanced Glycation End Product: A Biomarker for Acute Coronary Syndrome. *BioMed Research International* 2015 ID 815942 7 pages

Kalesnikoff J, Galli SJ. New developments in mast cell biology. *Nat Immunol* (2008) 9(11):1215–23.

Karmakar S, Jin Y, Nagaich AK. Interaction of glucocorticoid receptor (GR) with estrogen receptor (ER) α and activator protein 1 (AP1) in dexamethasone-mediated interference of ER α activity. *J Biol Chem*. 2013 Aug 16;288(33):24020-34.

Kass DA, Shapiro EP, Kawaguchi M, Capriotti AR, Scuteri A, deGroof RC, Lakatta EG. Improved arterial compliance by a novel advanced glycation end-product crosslink breaker. *Circulation*. 2001; 104: 1464–1470.

Kim E, Seo S, Chung H, Park S. Role of Glucocorticoids in Fasting-induced Changes in Hypothalamic and Pituitary Components of the Growth Hormone (GH)-axis. *Korean J Physiol Pharmacol*. 2008 v.12 p.217-23.

Kowluru RA. Effect of advanced glycation end products on accelerated apoptosis of retinal capillary cells under in vitro conditions. 2005. *Life Sci* v.76 p.1051–1060.

Landsteiner K. Experiments on anaphylaxis to azoproteins. *J Exp Med*. 1924 Apr 30; 39(5):631-7.

Li DX., Deng TZ., Lv J., Ke J.. Advanced glycation end products (AGEs) and their receptor (RAGE) induce apoptosis of periodontal ligament fibroblasts. *Braz J Med Biol Res*. 2014 Dec;47(12):1036-43. Epub 2014 Sep 19.

Liddicoat DR, Kyparissoudis K, Berzins SP, Cole TJ, Godfrey DI. The glucocorticoid receptor 1A3 promoter correlates with high sensitivity to glucocorticoid-induced apoptosis in human lymphocytes. *Immunol Cell Biol*. 2014 Nov;92(10):825-36.

Lindholm J. Cushing's disease, pseudo-Cushing states and the dexamethasone test: a historical and critical review. *Pituitary*. 2014 Aug;17(4):374-80

Liu XX, Zhu XM, Miao Q, Ye HY, Zhang ZY, Li YM. Hyperglycemia induced by glucocorticoids in nondiabetic patients: a meta-analysis. *Ann Nutr Metab*. 2014;65(4):324-32

Maldonado CA, Sundblad V, Salatino M, Elia J, García LN, Leimgruber C, Croci DO, Rabinovich GA. Cell-type specific regulation of galectin-3 expression by

glucocorticoids in lung Clara cells and macrophages. *Histol Histopathol.* 2011 Jun;26(6):747-59.

Malmstedt J, Frebelius S, Lengquist M, Jörneskog G, Wang J, Swedenborg J. The Receptor for Advanced Glycation End Products (Rage) and Its Ligands in Plasma and Infrainguinal Bypass Vein. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2016 Feb 20. pii: S1078-5884(15)00925-9.

Mangos GJ, Whitworth JA, Williamson PM, Kelly JJ. Glucocorticoids and the kidney. *Nephrology (Carlton).* 2003. v.8 p.267-73.

McDonough AK, Curtis JR, Saag KG. The epidemiology of glucocorticoid-associated adverse events. *Curr Opin Rheumatol.* 2008.v.20 p.131–137.

Menini S, Iacobini C, Fantauzzi CB, Pesce CM e Pugliese G. Role of Galectin-3 in Obesity and Impaired Glucose Homeostasis. *Oxid Med Cell Longev.* 2016; 2016: 9618092

Metcalf DD, Boyce JA. Mast cell biology in evolution. *J Allergy Clin Immunol* (2006) 117(6):1227–9. 10.1016/j.jaci.2006.03.031

Metzler DE, Ikawa M, Snell EE. A general mechanism for vitamin B6-catalyzed reactions. *J Am Chem Soc.* 1954; 76: 648–652

Min C, Kang E, Yu SH, Shinn SH, Kim YS. Advanced glycation end products induce apoptosis and procoagulant activity in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Diabetes Res Clin Pract.* 1999 Dec;46(3):197-202.

Mirzahosseini A, Dalmadi B, Csutora P. *Cell Immunol.* Histamine receptor H4 regulates mast cell degranulation and IgE induced FcεRI upregulation in murine bone marrow-derived mast cells. 2013. v.3 p.38-44.

Mitsuhiro U, Fumi I, Toshiyuki T, Yoko Si and Toru K. Novel phenotype in beagle dogs characterized by skin response to compound 48/80 focusing on skin mast cell degranulation. *Exp Anim.* 2015;64(4): 333–341.

Moon TC, ST Laurent CD, Morris KE, Marcet C, Yoshimura T, Sekar Y, Befus AD. Advances in mast cell biology: new understanding of heterogeneity and function. *Mucosal Immunol.* 2010 v.3 p.111–128.

Nittoh T, Fujimori H, Kozumi Y, Ishihara K, Mue S, Ohuchi K. Effects of glucocorticoids on apoptosis of infiltrated eosinophils and neutrophils in rats. *Eur J Pharmacol.* 1998. v.31 p.354(1):73-81.

Okamoto T, Yamagishi S, Inagaki Y, Amano S, Koga K, Abe R, Takeuchi M, Ohno S, Yoshimura A, Makita Z. Angiogenesis induced by advanced glycation end products and its prevention by cerivastatin. *FASEB J.* 2002; 16: 1928–1930.

Portier P, Richet C. De l'action anaphylactique de certains venins. C. R. Soc. Biol. 1902;54:170–172

Rao NA, McCalman MT, Moulos P, Francoijs KJ, Chatziioannou A, Kolisis FN, Alexis MN, Mitsiou DJ, Stunnenberg HG. Coactivation of GR and NFKB alters the repertoire of their binding sites and target genes. Genome Res. 2011 Sep;21(9):1404-16.

Saenger AK. Discovery of the Wonder Drug: From Cows to Cortisone. Clinical Chemistry 2010 June;56(8):1349-1350

Sakuma I, Higuchi S, Fujimoto M, Takiguchi T, Nakayama A, Tamura A, Kohno T, Komai E, Shiga A, Nagano H, Hashimoto N, Suzuki S, Mayama T, Koide H, Ono K, Sasano H, Tatsuno I, Yokote K, Tanaka T. Cushing Syndrome Due to ACTH-Secreting Pheochromocytoma, Aggravated by Glucocorticoid-Driven Positive-Feedback Loop. J Clin Endocrinol Metab. 2016 Mar;101(3):841-6

Sarett LH. Partial synthesis of pregnene-4-triol-17(β), 20(β), 21-dione-3, 11 and pregnene-4-diol-17(β), 21-trione-3,11,20 monoacetate. BiolChem 1946;162:601–31

Schakman O, Kalista S, Barbé C, Loumaye A, Thissen JP. Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy. Int J Biochem Cell Biol. 2013 Oct;45(10):2163-72

Schalkwijk C e Miyata T. Early- and advanced non-enzymatic glycation in diabetic vascular complications: the search for therapeutics Amino Acids. 2012 Apr; 42(4): 1193–1204.

Schemann M, Kugler EM, Buhner S, Eastwood C, Donovan J, Jiang W, Grundy D. The mast cell degranulator compound 48/80 directly activates neurons. PLoS One. v.7 p. e52104. 2012.

Shalit M e Levi-Schaffer F. Challenge of mast cells with increasing amounts of antigen induces desensitization. Clin Exp Allergy. 1995 Sep;25(9):896-902

Sibilano R, Frossi B, Pucillo CE. Mast cell activation: a complex interplay of positive and negative signaling pathways. Eur J Immunol (2014) 44(9):2558–66.

Silverstein AM. Clemens Freiherr von Pirquet: explaining immune complex disease in 1906. Nat Immunol. 2000 Dec; 1(6):453-5.

Singh R, Barden A e Mori T. Beilin. LAdvanced glycation end-products: a review. Diabetologia. 2001 Feb; 44(2):129-46.

Snell EE. The vitamin activities of 'pyridoxal' and 'pyridoxamine.' J Biol Chem. 1944; 154: 313–314.

Snell EE. The vitamin B6 group, V: the reversible interconversion of pyridoxal and pyridoxamine by transamination reactions. J Am Chem Soc.1945; 67: 194–197

Stitt AW, Bucala R e Vlassara H. Atherogenesis and advanced glycation: promotion, progression, and prevention. *Ann N Y Acad Sci.* 1997; 811: 115–127; discussion 127–129

Streetly MJ, Maharaj L, Joel S, Schey SA, Gribben JG, Cotter FE. GCS-100, a novel galectin-3 antagonist, modulates MCL-1, NOXA, and cell cycle to induce myeloma cell death. *Blood.* 2010 May 13;115(19):3939-48

Supajatura V, Ushio H, Nakao A, Akira S, Okumura K, Ra C, et al. Differential responses of mast cell toll-like receptors 2 and 4 in allergy and innate immunity. *J Clin Invest* (2002) 109(10):1351–9.

Swierczewska M, Ostalska-Nowicka D, Kempisty B, Nowicki M, Zabel M. Molecular basis of mechanisms of steroid resistance in children with nephrotic syndrome. *Acta Biochim Pol.* 2013.v.60(3) p.339-44.

The Adrenal Gland Tumors. History. Acessado em 16 fev 2016. Disponível em <http://www.adrenaltumors.org/history>

Van Der Kleij HP, Ma D, Redegeld FA, Kraneveld AD, Nijkamp FP, Bienenstock J. Functional expression of neurokinin 1 receptors on mast cells induced by IL-4 and stem cell factor. *J Immunol.* 2004. v.171 p.2074–2079.

Van Laethem F, Baus E, Andris F, Urbain J, Leo O. A novel aspect of the anti-inflammatory actions of glucocorticoids: inhibition of proximal steps of signaling cascades in lymphocytes. *Cell Mol Life Sci.* 2001.v. 58 p.1599-606.

Vandevyver S, Dejager L, Libert C. On the trail of the glucocorticoid receptor: into the nucleus and back. *Traffic.* 2012.13:364–374.

Virk H, Arthur G e Bradding P. Mast cells and their activation in lung disease January 19, 2016 (disponível em [http://www.translationalres.com/article/S1931-5244\(16\)00029-3/pdf](http://www.translationalres.com/article/S1931-5244(16)00029-3/pdf))

Wautier JL, Zoukourian C, Chappey O, Wautier MP, Guillausseau PJ, Cao R, Hori O, Stern D, Schmidt AM. Receptor-mediated endothelial cell dysfunction in diabetic vasculopathy: soluble receptor for advanced glycation end products blocks hyperpermeability in diabetic rats. *J Clin Invest.* 1996; 97: 238–243.

Welbourn RB. *The History of Endocrine Surgery.* Praeger Publishers 1990.

Wernersson S e Pejler G. Mast cell secretory granules: armed for battle. *Nature Reviews Immunology.* 2014 14, 478–494

Whitfield GK, Jurutka PW, Haussler CA, Haussler MR. Steroid hormone receptors: evolution, ligands, and molecular basis of biologic function. *J Cell Biochem*1999. v. Suppl 32–33:110–122.

Wilkinson-Berka JL, Kelly DJ, Koerner SM, Jaworski K, Davis B, Thallas V, Cooper ME. ALT-946 and aminoguanidine, inhibitors of advanced glycation, improve severe nephropathy in the diabetic transgenic (mREN-2)27 rat. *Diabetes*. 2002; 51: 3283–3289

Witorsch RJ. Effects of elevated glucocorticoids on reproduction and development: relevance to endocrine disruptor screening. *Crit Rev Toxicol*. 2016 feb;25:1-17

Wommack JC, Salinas A, Delville Y. Glucocorticoids and the development of agonistic behaviour during puberty in male golden hamsters. *J Neuroendocrinol*. 2005.v.17 p.81-7.

Xue J, Gao X, Fu C, Cong Z, Jiang H, Wang W, Chen T, Wei Q, Qin Regulation of galectin-3-induced apoptosis of Jurkat cells by both O-glycans and N-glycans on CD45. *FEBS Lett*. 2013 Dec 11;587(24):3986-94.

Yalcin AD. Advances in anti-IgE therapy. *Biomed Res Int*. 2015;2015:317465.

Yan SD, Schmidt AM, Anderson GM, Zhang J, Brett J, Zou YS, Pinsky D, Stern D. Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. *J Biol Chem*. 1994; 269:9889–9897

Yuen KC, Chong LE, Riddle MC. Influence of glucocorticoids and growth hormone on insulin sensitivity in humans. *Diabet Med*. 2013.v.30. p.651-63.

Zafar H, Sheikh MA, Hussain F e Maan MA. Inhibition of protein glycation and advanced glycation end products by ascorbic acid *African Journal of Biotechnology* 2012 June Vol 11(51), pp. 11309-11314, 26